

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARÍLIA LOCATELLI CORRÊA

XILOGLUCANA: ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR EM
PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI CONTRA *Colletotrichum gloeosporioides*

CURITIBA

2009

MARÍLIA LOCATELLI CORRÊA

XILOGLUCANA: ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR EM
PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI CONTRA *Colletotrichum gloeosporioides*

Monografia apresentada à disciplina
Estágio em Bioquímica como requisito
parcial à conclusão do Curso de
Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Carmen L. de
Oliveira Petkowicz
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia
Dalzoto

CURITIBA

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela graça da vida;

À meus queridos pais que dedicaram suas vidas a mim e à Rafa. Por terem muitos vezes esquecido de seus sonhos para realizar os nossos. Obrigada pelo carinho, dedicação e amor que sempre me deram. Obrigada por terem proporcionado condições para que eu pudesse me dedicar aos estudos e pela confiança que sempre depositaram em mim. Nenhuma palavra será suficiente para agradecer tudo o que já recebi de vocês. Amo vocês!

Mãezinha, se não fosse por você seria difícil continuar em frente, sem sua ajuda, paciência, carinho, dedicação durante toda essa etapa da minha vida.

À minha querida irmã Rafaella, por ter sido minha companheira, mestre e amiga durante toda a minha vida. Por ter compartilhado os bons e maus momentos e estar sempre presente e disposta a me ajudar. Sempre carinhosa e meiga, um exemplo de pessoa. Te amo, maninha.

Ao meu esposo Rodrigo, agradeço toda a paciência e carinho que teve comigo durante toda a realização deste trabalho. Por me ensinar a amadurecer e me consolar sempre que algo dava errado. Pelo amor dedicado à mim e por me fazer tão feliz. Amo você!

Ao meu querido vovô, sempre presente em todas as etapas da minha vida, que sempre participou da minha educação e vibrou com as minhas vitórias. À Rosi, pelo carinho e amizade que dedica a mim.

Às minhas amigas de faculdade, Meire e Anne sempre parceiras, amigas, companheiras durante o período da faculdade. Obrigada pelos ensinamentos, pelas conversas confortadoras, pela ajuda nos momentos difíceis. Foi muito bom ter conhecido vocês e teria sido difícil estes quatro anos sem uma amizade como a nossa! À Rayana, que apesar de termos nos conhecido tarde na faculdade, construímos uma amizade muito forte e sincera.

À minha orientadora Carmem, por me proporcionar três anos de aprendizado no laboratório de Química de Carboidratos Vegetais, da UFPR. Pelo auxílio na realização dos projetos, pelas dicas, ensinamentos, amizade e dedicação.

Agradeço a Prof^a. Joana pela amizade e carinho que tem por mim e por sempre estar disposta a ajudar. À Lúcia, meiga, alegre e amiga, obrigada pela

paciência, ajuda e carinho.

Aos meus colegas do laboratório, Nicole, Marina, Marianna, Rogério, Heide, Maíra, Alessandra, João, Larry, Eliz, pelos bate-papos distraídos, risadas e dicas durante estes anos.

Obrigada à Prof^a. Patrícia Dalzoto, por ceder o laboratório para que eu pudesse realizar meus experimentos, pelo carinho, dicas, correções e ensinamentos que me proporcionou.

Ao LabGeM que gentilmente cedeu o fungo *C. gloeosporioides* utilizado neste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia (Lab Micro) do departamento de Patologia Básica, desta universidade, que me recebeu durante todos esses meses e me ensinou a trabalhar com microrganismos, em especial a Patrícia, Ângela, Mariana e Rayana.

Ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, desta universidade, por me ceder durante alguns meses a casa de vegetação para cultivo das plantas de feijão-caupi.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

As xiloglucanas são polissacarídeos de reserva encontrados em algumas espécies de Leguminosae, servindo como fonte de carbono para promover o crescimento inicial da planta. Este heteropolissacarídeo também está presente na parede celular primária de plantas dicotilêdoneas e monocotilêdoneas não-comelinóides, desempenhando uma função estrutural. Estudos anteriores já demonstraram que as xiloglucanas de reserva e estrutural apresentam várias aplicações biológicas, tanto em modelos animais como vegetais. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar as xiloglucanas de reserva dos cotilédones de *Copaifera langsdorffii* (copaíba) e *Hymenaea courbaril* (jatobá), obtidas por extração aquosa, e utilizá-las em ensaios biológicos visando a proteção de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) contra o fungo causador da doença antracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*. A composição monossacarídica das amostras obtidas através das extrações aquosas de copaíba e jatobá confirmou a presença de xiloglucanas, com perfil homogêneo por HPSEC-MALLS/RI e M_w de $7,48 \times 10^5$ g/mol para a copaíba e $8,48 \times 10^5$ g/mol para o jatobá. Neste trabalho foi realizado um ensaio biológico *in vitro* a fim de verificar o efeito das xiloglucanas e de outros compostos extraídos de plantas sobre o crescimento micelial do patógeno *C. gloeosporioides*. Dentre as substâncias testadas, apenas o óleo extraído de sementes de copaíba apresentou um efeito sobre o fungo, inibindo visivelmente o crescimento do micélio, porém estimulando a esporulação. As xiloglucanas de copaíba e jatobá não interferiram no desenvolvimento do patógeno. Um ensaio *in vivo* foi realizado para investigar o efeito das xiloglucanas de jatobá e copaíba no controle da doença antracnose em plantas de feijão-caupi. Oligossacarídeos obtidos através da hidrólise da xiloglucana de copaíba com a enzima celulase e os oligos- obtidos do extrato etanólico da precipitação da xiloglucana, também foram utilizados nos testes *in vivo* como indutores de resistência. Plantas com 21 dias foram tratadas na superfície adaxial das folhas primárias com os oligos- e polissacarídeos e após 72 horas, o patógeno *C. gloeosporioides* foi inoculado na mesma superfície. Um grupo controle recebeu água ao invés de indutor e outro não foi inoculado com o patógeno. A severidade da doença foi avaliada em intervalos de uma semana, sendo quantificadas as folhas sadias do grupo em relação ao total de folhas primárias. Até o 15º dia após a inoculação do patógeno na planta, cinco tratamentos foram efetivos em controlar a antracnose no feijão-caupi. A xiloglucana de copaíba foi testada em concentrações crescentes, variando de 12,5 a 1000 µg/ml, sendo que as doses de 50, 500 e 1000 µg/ml, apresentaram os melhores resultados de proteção: cerca de 60 a 70%. Os oligossacarídeos também foram eficientes no controle da doença antracnose nas plantas de feijão-caupi, com grau de proteção em torno de 60%. Estes tratamentos foram capazes de retardar o desenvolvimento da doença nas plantas, mas não induziram proteção sistêmica, pois a partir da terceira semana da inoculação do patógeno, a doença evoluiu rapidamente em todos os tratamentos e grupos controle.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 REVISÃO DE LITERATURA	08
2.1 XILOGLUCANA – ASPECTOS GERAIS	08
2.1.1 Aplicações biológicas	10
2.2 <i>Hymenaea courbaril</i>	11
2.3 <i>Copaifera langsdorffii</i>	12
2.4 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	13
2.5 PLANTA HOSPEDEIRA: FEIJÃO-CAUPI	14
2.6 DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA ANTRACNOSE EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI	16
2.7 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS	20
2.7.1 Indução de resistência em plantas	21
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO XILOGLUCANA	25
4.1.1 Extração das xiloglucanas de reserva	25
4.1.2 Determinação da composição monossacarídica	25
4.1.3 Dosagens colorimétricas	26
4.1.4 Análise por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) acoplada a detectores de espalhamento de luz laser multiângulos (MALLS) e índice de refração (RI)	26
4.2 OBTENÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE COPAÍBA	27
4.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO DAS SEMENTES COPAÍBA	28
4.4 ENSAIO BIOLÓGICO <i>IN VIVO</i>	28
4.4.1 Cultivo da planta hospedeira	28
4.4.2 Obtenção e cultivo de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	29

4.4.3 Preparação do inóculo para aplicação nas plantas.....	30
4.4.4 Preparo das soluções para aplicação nas plantas.....	30
4.4.5 Montagem do experimento.....	30
4.4.6 Ensaio de proteção local.....	31
4.4.7 Ensaio de proteção sistêmica.....	32
4.5 ENSAIO BIOLÓGICO <i>IN VITRO</i>	32
4.5.1 Método da difusão em disco de papel.....	32
4.5.2 Método da difusão em meio sólido.....	33
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	36
5.2 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	41
5.3 ENSAIO BIOLÓGICO <i>IN VIVO</i>	43
5.4 ENSAIO BIOLÓGICO <i>IN VITRO</i>	50
6 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos encontrados em vegetais normalmente são divididos em três grupos distintos: polissacarídeos de reserva, polissacarídeos de parede celular e exsudatos. Entre os polissacarídeos de reserva destacam-se as xiloglucanas, encontradas em sementes de algumas espécies Leguminosae. Também são importantes componentes estruturais da parede celular vegetal. As xiloglucanas de reserva e estrutural têm sido muito estudadas e apresentam várias aplicações biológicas, tanto em modelos animais quanto vegetais. Neste trabalho foram isoladas xiloglucanas de reserva e utilizadas em ensaios biológicos visando a proteção de plantas de feijão-caupi contra o fungo patogênico *Colletotrichum gloeosporioides*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 XILOGLUCANA – ASPECTOS GERAIS

A parede celular primária das células vegetais é composta por uma rede de fibras de celulose entrelaçadas fortemente com hemiceluloses, imersas em uma matriz de pectina (MCCANN; ROBERTS, 1991). Em dicotiledôneas e monocotiledôneas não-comelinóides, o polissacarídeo xiloglucana é a hemicelulose principal.

A xiloglucana é um heteropolissacarídeo que desempenha uma importante função na definição das propriedades estruturais da parede celular. Além disso, participa da regulação do crescimento e desenvolvimento da planta (LEVY *et al.*, 1997) e do controle da expansão celular (FRY, 1989). As xiloglucanas também podem apresentar função regulatória, pois seus oligossacarídeos, os quais são denominados oligossacarinas, regulam o crescimento celular (HAYASHI, 1989).

Além da função estrutural que a xiloglucana apresenta na parede celular, em algumas sementes de dicotiledôneas, este polímero pode também ser encontrado atuando como reserva energética.

Sementes dos gêneros *Copaifera* e *Hymenaea* utilizam a xiloglucana armazenada na parede celular de seus tecidos de reserva (cotilédones) como fonte

de carbono para promover o crescimento inicial da planta. Esta característica tem sido correlacionada com o sucesso na colonização de biomas, como a Amazônia e as savanas na América do Sul, onde as condições ambientais não são muito favoráveis (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

A xiloglucana é composta por uma cadeia principal formada por unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). A cadeia principal pode ser substituída em O-6 por unidades de α -D-xilopirranose, a qual pode ser substituída em O-2 por unidades de β -D-galactopirranose (WHITE; RAO, 1953). A estrutura básica da xiloglucana de reserva e a estrutural são semelhantes, apresentando D-glucose, D-xilose e D-galactose em proporção de aproximadamente 4:3:1, respectivamente (McNEIL; DARVILL; FRY, 1984). Entretanto, nas xiloglucanas de parede celular primária, as unidades de β -D-galactopirranose podem ser substituídas em O-2 por unidades de α -L-fucose (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

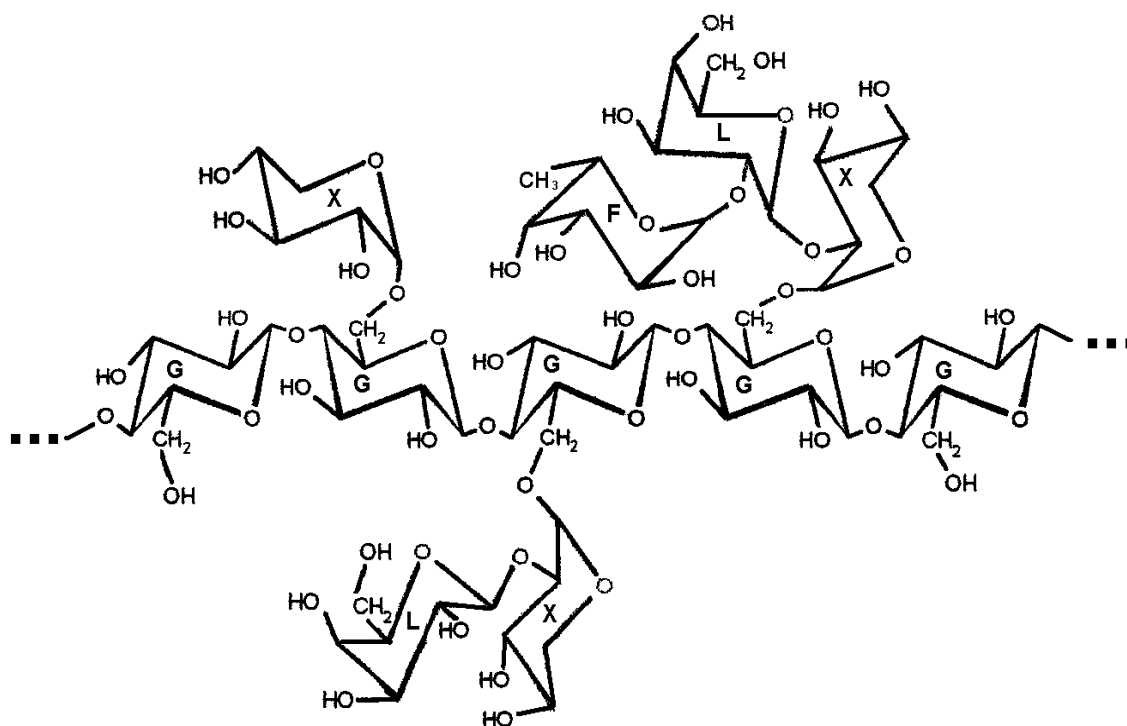


Figura 2.1 – Representação de um segmento da cadeia de xiloglucana estrutural. Glucose (G), Xilose (X), Galactose (L) e Fucose (F).

FONTE: Petkowicz *et al.* (2006).

Xiloglucanas são polissacarídeos com uma notável regularidade estrutural. A hidrólise da xiloglucana com a enzima celulase produz um padrão típico de oligossacarídeos, os quais são compostos por uma cadeia principal de quatro unidades de glucose, sendo três delas com ramificações de xilose. Uma representação para os oligossacarídeos foi estabelecida por Fry *et al.* (1993), em que X indica a glucose da cadeia principal substituída com xilose, G indica a glucose não substituída e L indica que a unidade de xilose ligada a uma glucose da cadeia principal está substituída por uma unidade de galactose.

As xiloglucanas de reserva encontradas em sementes de muitas dicotiledôneas apresentam oligossacarídeos com ramificações de galactose como XLXG, XXLG e XLLG (BRANDÃO *et al.*, 2009). Em sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) a xiloglucana é altamente galactosilada, sendo os oligossacarídeos, obtidos por digestão com a enzima celulase, compostos principalmente por XLLG e, em menores proporções, por outros tipos de oligossacarídeos como XXXG, XXLG e XLXG (OLIVEIRA JUNIOR; BRAGA; BUCKERIDGE, 2006).

2.1.1 Aplicações biológicas

Os carboidratos que atuam como moléculas sinalizadoras em plantas são chamados de oligossacarinas e podem desencadear respostas de defesa ou afetar o crescimento e desenvolvimento da planta (DARVILL *et al.*, 1992).

A primeira evidência de que oligo- e polissacarídeos são capazes de atuar como moléculas sinalizadoras em plantas veio de estudos com a ativação de respostas de defesa em plantas contra o ataque de patógenos (MOHNEN; HAHN 1993). Um oligossacarídeo obtido a partir da hidrólise de pectina da parede celular da soja foi capaz de induzir a síntese de fitoalexinas nestas plantas (HAHN; DARVILL; ALBERSHEIN, 1981). Fitoalexinas são compostos antimicrobianos sintetizados pela planta que se acumulam nas células vegetais em resposta à infecção, limitando a propagação do patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1995). O acúmulo de fitoalexinas nos tecidos de plantas representa uma resposta de defesa regulada contra o agente invasor (DEGOUSÉE; TRIANTAPHYLIDÈS; MONTILLET ¹

¹ DEGOUSÉE, N.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; MONTILLET, J.L. Involvement of oxidative processes in the signaling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*). Plant Physiology, Rockville, v.104, n.3, p. 945-952, 1994.

1994, apud RIZZARDI, *et al.*, 2003).

Um nonassacarídeo, obtido da hidrólise com endo- β -1,4-glucanase de uma xiloglucana extraída da suspensão de cultura de células de *Acer pseudoplatanus*, apresentou um efeito inibitório na estimulação da auxina sobre o alongamento de segmentos do caule de plantas de ervilha (McDOUGALL; FRY, 1988).

Salamoni *et al.* (2008) observou que as xiloglucanas de sementes quando adicionadas em meio de cultura promoviam um maior crescimento do hipocótilo das plântulas de *Arabidopsis thaliana in vitro*, sendo que o crescimento da raiz também foi significativamente maior.

Lima-Nishimura *et al.* (2003) observaram que em meio de cultura para micropropagação, enriquecido com xiloglucana de sementes de jatobá, o desenvolvimento de plântulas provenientes de duas espécies da macieira (*Malus prunifolia* e *Malus domestica*) foi superior ao controle.

Na literatura há relatos de que xiloglucanas, extraídas de diferentes plantas, também apresentam atividade biológica em modelos animais. No estudo de Rosário (2006), as xiloglucanas obtidas das sementes de copaíba e jatobá foram capazes de promover a ativação *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongo, bem como de ativar macrófagos *in vivo*, aumentando a atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal.

Cao e Ikeda (2009) analisaram a atividade antioxidante e antitumoral de derivados de xiloglucana *in vitro*. Os resultados deste estudo indicaram que a xiloglucana sulfatada e derivados selênio-éster podem restringir o crescimento de células cancerosas *in vitro*.

2.2 *Hymenaea courbaril*

Conhecida popularmente pelos nomes de jatobá, jataí, jataí-amarelo, jataí-peba, imbiúva dentre outros, é uma árvore que alcança de 15-20 m de altura, possuindo folhas compostas e fruto do tipo legume indeiscente. Cada fruto possui de duas a quatro sementes (LORENZI, 2002).

Esta espécie está incluída na ordem Fabales, família Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae (APG II, 2003). É encontrada do Piauí até o norte do Paraná em

floresta semidecídua. Sua madeira é utilizada na construção civil, bem como na fabricação de móveis. O fruto contém uma farinha nutritiva, consumida tanto pelo homem, quanto por animais silvestres (LORENZI, 2002).

O polissacarídeo xiloglucana foi detectado pela primeira vez nas sementes de jatobá por Kooiman (1960). A estrutura química deste polímero foi posteriormente determinada por análises de metilação por Lima *et al.* (1993).

Os cotilédones das sementes desta espécie apresentam aproximadamente 45% de sua massa seca como xiloglucana (BUCKERIDGE; DIETRICH, 1990).

Enquanto que a maioria das xiloglucanas de reserva extraídas de sementes apresentam um padrão semelhante de oligossacarídeos, a xiloglucana extraída das sementes de jatobá (*H. courbaril*) possui características estruturais únicas. Quando tratada com a enzima celulase, são obtidos também oligossacarídeos da família XXXXG, formada por cinco glucoses na cadeia principal, sendo que quatro delas encontram-se ramificadas com unidades de xilose (BUCKERIDGE *et al.*, 1992,1997). Na maioria das sementes, os oligossacarídeos obtidos da degradação da xiloglucana são formados por apenas quatro glucoses na cadeia principal e fazem parte da família XXXG.



Figura 2.2 – Frutos, árvore e sementes de jatobá.

FONTE: Figuras disponíveis em: <http://www.kingsnake.com/westindian/hymenaea_courbaril2.jpg>; <<http://farm4.static.flickr.com>>; Acesso em: 27/08/2009

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Ed. Plantarum, 1992. p. 155.

2.3 *Copaifera langsdorffii*

A espécie vegetal em estudo é conhecida popularmente como copaíba, copaíba vermelha, bálsamo, oleiro, podói, cupiúva. É encontrada em Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná, principalmente na floresta latifoliada da Bacia do Paraná (LORENZI, 2002).

Esta espécie está incluída na ordem Fabales, família Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae, segundo a classificação botânica APG II (2003).

A árvore com altura de 10-15 m possui uma copa globosa e densa. Sua madeira é utilizada na construção civil e a seiva, extraída a partir de furos no tronco é grandemente estudada, devido ao seu alto potencial terapêutico. Esta seiva também é chamada de bálsamo ou óleo de copaíba (LORENZI, 2002). Este óleo teve suas propriedades farmacológicas estudadas, sendo confirmada sua eficácia como antiinflamatório (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2007), protetor gástrico (PAIVA *et al.*, 1998) e antifúngico (BANDEIRA *et al.*, 2006).

A presença de xiloglucanas nos cotilédones de *C. langsdorffii* foi relatada pela primeira vez por Buckeridge e Dietrich (1990). A função de reserva das xiloglucanas nas sementes dessa mesma espécie foi demonstrada por Buckeridge *et al.* (1992).



Figura 2.3 – Árvore, flores, frutos e sementes de copaíba.

FONTE: Figuras disponíveis em <<http://www.arvores.brasil.com.br/copaiba1.jpg>>; <<http://www.acessa.com>>; <http://www.ufpa.br/ccen/fisica/gfma/figuras/copaiba_semente.jpg>. Acesso em: 27/08/2009

2.4 *Colletotrichum gloeosporioides*

O gênero *Colletotrichum* é considerado como sendo um dos principais patógenos de planta do mundo. Espécies de *Colletotrichum* causam uma doença com sintomas típicos, conhecida como antracnose, caracterizada por lesões necróticas profundas nos tecidos, onde uma massa laranja de conídios é produzida (BAILEY, 1992).

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., é um fungo mitosporico e corresponde à fase anamórfica do fungo *Glomerella cingulata* (Stonemam) Spauld & Schrenk. A fase teleomórfica tem pouca importância no ciclo da doença antracnose, sendo, porém, responsável pelos processos que levam à variabilidade genética do patógeno (EMBRAPA, 2004).

C. gloeosporioides é encontrado infectando uma grande variedade de espécies de plantas, causando significativos danos econômicos em culturas de regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998).

C. gloeosporioides produz conídios dentro de corpos de frutificação chamados conidiomatas. Estas estruturas são esféricas, com células conidiogênicas revestindo a cavidade interna da parede ou são acérvulos (em forma de taça) e, neste caso, as células conidiogênicas formam uma paliçada na superfície do conidiomata (GUARRO *et al.*, 1998). Os acérvulos são sub-epidérmicos e dispostos em círculos. Os conídios são hialinos, ligeiramente curvados, com dimensões que variam de 12-21 x 4-6 µm, com as extremidades arredondadas (EMBRAPA, 2004).

Com relação à morfologia macroscópica, a coloração da colônia de *C. gloeosporioides* varia de branca a cinza escuro. Segundo Freeman, Katan e Shabi (1998), isolados deste gênero são, em geral, altamente sensíveis ao fungicida benomil.

2.5 PLANTA HOSPEDEIRA: FEIJÃO-CAUPI

Vigna unguiculata L. Walp., planta conhecida popularmente como feijão fradinho, feijão-de-corda ou feijão-caupi é um vegetal altamente adaptado e tolerante

a estresse abiótico. Sua cultura abrange regiões quentes da África, Ásia e Américas. Na América do Sul é amplamente cultivada no nordeste semi-árido do Brasil (EHLERS; HALL, 1997).

Segundo a Classificação Botânica APG II (2003), o feijão-caupi é uma leguminosa, pertencendo à ordem Fabales, família Fabaceae e subfamília Faboideae.

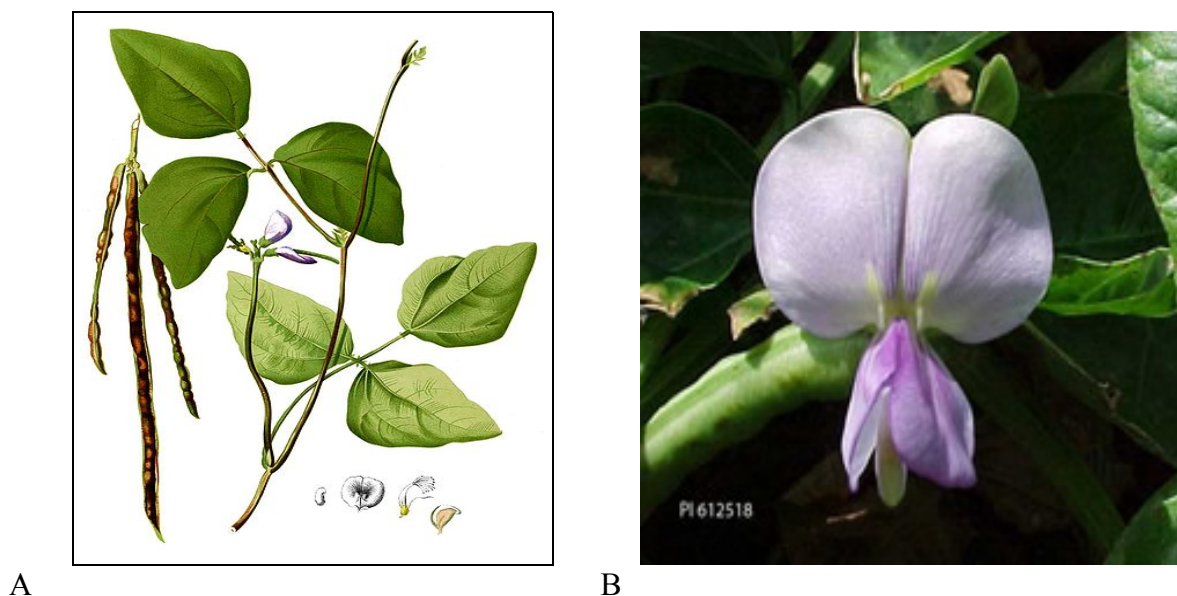


Figura 2.4 – Representação do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

NOTA: A - Representação esquemática das folhas, vagens e flor de *Vigna unguiculata*; B - Detalhe da flor.

FONTE: Figuras disponíveis em: <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File: Vigna ungui](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vigna_unguiculataBlanco2.285-cropped.jpg)
[culataBlanco2.285-cropped.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vigna_unguiculataBlanco2.285-cropped.jpg)> ;

< [http://www.loc.gov/.../mysteries/ blackeyedpeas .html](http://www.loc.gov/.../mysteries/blackeyedpeas.html). Acesso em 17/11/2009.

O feijão-caupi apresenta alto valor econômico no Brasil, que é o terceiro maior produtor do mundo (SINGH *et al.*, 2002). Sua produção é predominante nas Regiões Norte e Nordeste, onde apresenta grande importância por ser um dos principais componentes da dieta alimentar, especialmente na zona rural (EMBRAPA, 2003). Até pouco tempo atrás, a cultura do feijão-caupi era explorada no Brasil quase que exclusivamente por agricultores familiares, em padrões tradicionais, e tinha um mercado restrito. Nos últimos anos, houve um aumento da expressão econômica do

feijão-caupi, sendo cultivado em outras regiões brasileiras além do Norte e Nordeste e as exportações se intensificaram (EMBRAPA, 2003).

Segundo dados da Embrapa (2003), a área ocupada com feijão-caupi no mundo está em torno de 12,5 milhões de hectares, com 8 milhões (64% da área mundial) na parte oeste e central da África.

O feijão-caupi cresce tipicamente em regiões quentes, de baixa altitude das áreas equatoriais e subtropicais do globo, embora também ocorra em regiões com mais 1600 m no Kenya. Devido a seu valor nutricional superior, versatilidade e adaptabilidade, o feijão-caupi foi escolhido como uma das culturas para cultivo em estações espaciais (EHLERS; HALL, 1997).

O grão seco é o principal produto consumido pelo homem, no entanto, outras partes do vegetal também são consumidas em diversas regiões do mundo. Na África oriental, por exemplo, são consumidas as folhas da planta. Além disso, também é utilizada como forragem e adubo (EHLERS; HALL, 1997).

Segundo Bressani (1985) o valor nutricional do grão do feijão-caupi é semelhante ao do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), no entanto possui um maior nível de ácido fólico e baixos níveis de fatores produtores de flatulências.

De acordo com a Embrapa Meio-Norte (2003), o feijão-caupi é uma excelente fonte de proteínas (23-25% em média), com todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62% em média), vitaminas e minerais. Além disso, possui grande quantidade de fibras dietéticas, baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2%, em média).

Esta cultura é resistente a altas temperaturas, à baixa fertilidade do solo, devido a altas taxas de fixação de nitrogênio (ELOWAD; HALL, 1987) e simbiose com micorrizas (KWAPATA; HALL, 1985), além de ser resistente a solos ácidos e alcalinos (FERY, 1990).

Apesar de bem adaptada, sob o ponto de vista climático, esta espécie é constantemente atacada por patógenos, ocasionando perdas significativas na produção. Os principais patógenos que afetam o feijão-caupi no campo são os vírus, bactérias, fungos e nematóides (OLIVEIRA, 2006).

2.6 DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA ANTRACNOSE EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI

Diferentes espécies de *Colletotrichum* causam consideráveis perdas na produção do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cultivado nos trópicos úmidos (EMECHEBE; SHOYINKA, 1985).

Há alguns anos, considerava-se que o fungo causador da antracnose no feijão-caupi era uma forma de *C. lindemuthianum*, o patógeno do feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris*. Entretanto, alguns estudos baseados nas diferenças moleculares, morfológicas e antigênicas entre os patógenos do feijão-comum e do caupi, sugerem que o agente causador da antracnose em *Vigna unguiculata* seja uma forma de *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc. (BAILEY *et al.*, 1990; PAIN *et al.*, 1992; O'CONNELL; BAILEY, 1992)

Segundo Bailey *et al.* (1992) a doença antracnose aparece tanto nos tecidos em desenvolvimento das plantas quanto em tecidos maduros.

Perdas no campo de até 50% da produção, decorrentes da antracnose, têm sido reportadas em cultivares suscetíveis em condições de alta umidade na Nigéria, África, Brasil e Nicarágua (LATUNDE-DADA, 1990). Os danos desta doença em campo são significantes nos trópicos, porque diversas culturas são cultivadas em áreas próximas (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998).

Latunde-Dada *et al.* (1996) descrevem a estratégia de infecção do fungo *Colletotrichum* isolado de plantas de *Vigna unguiculata*, portadoras da antracnose. Neste estudo, os autores também analisam as seqüências de nucleotídeos das regiões D2 e ITS-2 do rDNA do fungo isolado, encontrando homologia de 94,9% com isolados de *C. gloeosporioides* previamente estudados por Sheriff *et al.* (1994).

A infecção do fungo na planta pode ser dividida em dois estágios. Durante a primeira fase, chamada biotrófica, o fungo fica restrito às células da epiderme (BAILEY *et al.*, 1990). Segundo Latunde-Dada *et al.* (1996), os conídios, inicialmente asseptados, quando em contato com a superfície da planta, tornam-se septados após a germinação. Kim, Daoxin e Pappachan (1998) demonstraram que o contato físico do fungo sobre o hospedeiro induz a síntese de proteínas quinase pelo fungo e, quando antagonistas destas proteínas são adicionados, a germinação dos

conídios e formação do apressório são inibidos. Isto sugere que a fosforilação de proteínas pode estar envolvida na indução da formação do apressório em *Colletotrichum*. Dessa forma, a germinação dos conídios do fungo seria desencadeada devido a uma resposta mecânica do patógeno à superfície de contato.

Em seguida à germinação, desenvolve-se um apressório composto por duas a três camadas de carboidratos, com melanina preferencialmente depositada em uma delas. Vários modos de penetração são possíveis: através de aberturas naturais, como por exemplo, os estômatos, através de ferimentos e pela penetração direta. Nesta última o apressório desenvolve um “peg” de infecção que penetra pela cutícula e pela parede de células do hospedeiro com pressão hidrostática e o auxílio de enzimas cutinolíticas e celulolíticas (EMBRAPA, 2004).

No experimento de Latunde-Dada *et al.* (1996), após 36 h da inoculação do patógeno, as células das folhas e dos hipocótilos das plantas já haviam sido penetradas. Neste estágio da infecção, surgem do apressório do conídio, estruturas intracelulares do fungo, formando uma vesícula de infecção, a qual se torna uma estrutura multisseptada e multilobada, após 72 h da inoculação do patógeno. A partir desta vesícula multilobada, desenvolvem-se hifas secundárias, as quais invadem os tecidos adjacentes da planta, degradando a parede das células. Esta fase é chamada necrotrófica (EMBRAPA, 2004). Os acérvulos foram produzidos em abundância 120 h após a inoculação e estes emergem através da cutícula para a superfície do hospedeiro infectado. Os acérvulos eram abundantemente circundados por conídios, os quais são produzidos por conidióforos curtos. Cada acérvulo possui uma única seta septada e melanizada (LATUNDE-DADA *et al.*, 1996).

Os sintomas causados pela antracnose podem ser observados em todas as partes aéreas da planta e, ocasionalmente, nas raízes. As lesões são tipicamente pardo-escuras, com contornos pardo-avermelhados. Nas vagens são observados os sintomas mais evidentes, caracterizados por lesões de formato variável, normalmente circulares, de coloração pardo-escura e deprimidas no centro. Nas sementes atacadas, ocorrem manchas pardas ou negras, levemente deprimidas e de tamanho variável. No caule e pecíolo as lesões são alongadas e deprimidas, podendo causar queda da folha (MICHEREFF, 2009).



Figura 2.5 – Plantas de feijão atacadas por antracnose em cultivo de inverno.

FONTE: MICHEREFF, S.J. Antracnose no feijão. In: Del Ponte, E.M. (Ed.) Fitopatologia.net - herbário virtual. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/agronomia/fitossan/fitopatologia/ficha.php?id=117#>> Acesso em: 29/11/2009.

A principal via de disseminação do fungo a longas distâncias são as sementes contaminadas, as quais atuarão como fonte de inóculo secundário, podendo passar para o caule, folha e vagens. Dentro de um mesmo campo, a doença é disseminada através de respingos de chuvas, orvalho, ventos, animais e implementos agrícolas que entram em contato com plantas doentes (MICHEREFF, 2009).

O desenvolvimento de *C. gloeosporioides* é favorecido por temperatura e umidade relativa elevadas. Seus conídios são liberados e disseminados quando os acérvulos se encontram úmidos (TAVARES *et al.*, 2005). O patógeno sobrevive nas sementes contaminadas tanto externamente como internamente, sob a forma de conídios e micélio dormente e também em restos de cultura contaminada no campo (MICHEREFF, 2009).

Para o controle deste e de outros patógenos, utilizam-se medidas preventivas como o emprego de sementes sadias, remoção e queima das plantas doentes, eliminação dos restos culturais, além do uso de produtos como bactericidas, fungicidas, nematicidas e inseticidas, usados em larga escala na agricultura mundial. Estas substâncias químicas, embora tenham proporcionado benefícios na produtividade da cultura, por outro lado trouxeram consideráveis danos ambientais.

Hoje, a agricultura moderna exige o desenvolvimento de tecnologias alternativas para o controle de doenças a fim de minimizar a degradação ambiental (OLIVEIRA, 2006).

2.7 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS

Atualmente a busca por métodos para o controle alternativo de doenças em plantas tornou-se objeto de estudos no setor acadêmico. A exigência mundial por alimentos isentos de agrotóxicos tem se tornado cada vez mais evidente.

O uso de agrotóxicos para o controle de doenças em plantas, apesar da eficiência comprovada, causa uma série de problemas ambientais, tais como a contaminação do solo e da água, além de danos ao homem e aos animais. A seleção de linhagens fúngicas resistentes a estes pesticidas é outro problema causado pelo uso contínuo destes produtos (MARTINS, 2006).

Dessa forma, é necessário o estudo de métodos alternativos para prevenção de doenças em plantas, tais como o uso de extratos vegetais, atuando como indutores de resistência, de forma a reduzir a necessidade do uso de agrotóxicos. Além disso, o uso desses extratos, por não envolver a síntese química, mostra-se uma alternativa barata (MARTINS, 2006).

Bautista-Baños *et al.* (2003) avaliaram o efeito fungicida da quitosana sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*. Neste estudo, os autores verificaram que o fungo é altamente sensível a quitosana, tendo seu crescimento afetado em concentrações de apenas 0,5% do polissacarídeo. A quitosana interferiu em vários estágios do desenvolvimento do patógeno, como no crescimento micelial, esporulação e morfologia da colônia.

Rozwalka (2003) investigou, em laboratório, o potencial de plantas medicinais, adubos foliares e ativadores de plantas, como métodos de controle alternativo da antracnose em goiabeira. O extrato e o óleo essencial do cravo-da-índia, assim como o óleo essencial do capim-limão inibiram em 100% o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*.

2.7.1 Indução de resistência em plantas

Os vegetais, ao longo de sua evolução, desenvolveram mecanismos para se defender de agressões causadas por agentes bióticos e abióticos. Alguns tipos de estresses ou uma pré-infecção por um patógeno podem tornar as plantas mais resistentes à infecção subsequente por outros patógenos (STADNIK; MARASCHIN, 2004).

A resistência natural das plantas a agentes patogênicos é baseada em uma grande variedade de barreiras e de mecanismos de defesa já existentes (FODOR; JOZSA; KIRALY, 1998). Estes podem ser divididos em estruturais e bioquímicos. Dentre os estruturais, podemos citar barreiras mecânicas, como a presença de tricomas e a deposição de substâncias para conter o patógeno e dentre os bioquímicos, o aumento na síntese de compostos fenólicos e fitotoxinas (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Além desses, as plantas possuem outros mecanismos de defesa mais eficientes que permanecem inativos ou latentes, que são acionados ou ativados após a exposição e/ou contato com agentes de indução (FODOR; JOZSA; KIRALY, 1998). A infecção causada por um patógeno ou o tratamento de plantas com diversos agentes podem atuar como indutores de resistência em plantas (VALLAD; GOODMAN, 2004). Estes mecanismos de defesa que são ativados após o contato com agentes de indução constituem-se na lignificação, produção de fitoalexinas, inibidores de proteases e proteínas relacionadas com a patogênese (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

O aumento dos níveis de resistência da planta, como uma consequência da ativação de seus genes ou grupos de genes aparentemente inativos, usando agentes externos, sem a modificação do genoma da planta, é conhecido como resistência induzida (STADNIK; MARASCHIN, 2004). Esta ocorre de maneira não-específica, por meio da ativação de genes que codificam para diversas respostas de defesa, tais como as proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), como por exemplo as quitinases e glucanases (BONALDO; PASCHOLATI, ROMEIRO, 2005). Neste tipo de indução, o agente indutor usualmente é um não-patógeno (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

Como outras espécies vegetais, o feijão-caupi apresenta várias reações de defesa quando infectado por vírus, bactérias, fungos e nematóides (OLIVEIRA, 2006). Barreto *et al.* (2006) avaliaram as respostas bioquímicas de defesa de *Vigna unguiculata* contra o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. A atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) aumentou em dois diferentes momentos após inoculação com o patógeno. Os autores sugerem que o primeiro pico pode estar associado a biossíntese inicial de compostos fenólicos e o segundo ao acúmulo posterior de compostos fenólicos e lignificação da parede celular do hospedeiro. Isto sugere que a PAL tem um importante papel nas estratégias de defesa que o feijão-caupi emprega para se defender da infecção causada pelo fungo *C. gloeosporioides*. Além disso, os autores observaram um acúmulo de H_2O_2 nas folhas inoculadas, sugerindo que este composto possa agir como um agente tóxico diretamente sobre o patógeno, já que o H_2O_2 se concentrou nas regiões de maior concentração de esporos (BARRETO *et al.*, 2006).

Latunde-Dada e Lucas (2001) verificaram que o feijão-caupi é capaz de responder a indutores exógenos, potencializando as respostas de defesa constitutivas da planta. Os autores trataram sementes de feijão-caupi com o composto acibenzolar-S-metil e observaram uma restrição do desenvolvimento do fungo *Colletotrichum destructivum* nos tecidos da planta. Este ativador foi efetivo na proteção contra a antracnose, restringindo o patógeno ao sítio de penetração, impedindo assim sua disseminação. Além disso, a penetração do apressório foi dificultada, sugerido um reforço do espessamento da parede celular da planta hospedeira. O aumento da resistência da planta ao patógeno foi relacionada com a rápida indução de duas enzimas chaves na via fenilpropanóide: a fenilalanina amônia-liase (PAL) e a chalcona isomerase (CHI). Concomitantemente, houve acumulação precoce de isoflavonóides com atividade de fitoalexinas nos hipocótilos tratados (LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001).

Neste sentido, a indução de resistência a doenças em plantas vem gerando resultados promissores e se firmando como uma opção menos agressiva à saúde humana e ao equilíbrio de agroecossistemas (STADNIK; MARASCHIN, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar as xiloglucanas de reserva dos cotilédones de copaíba e jatobá, extraídas através de extração aquosa, e utilizá-las em ensaios biológicos visando a proteção de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) contra o fungo causador da doença antracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar xiloglucanas de reserva dos cotilédones das sementes de copaíba e jatobá, através de extração aquosa;
- Obter misturas de oligossacarídeos naturais e provenientes de tratamento enzimático de xiloglucanas;
- Analisar as xiloglucanas isoladas quanto ao teor de açúcar total, proteína, composição monossacarídica, homogeneidade e massa molar;
- Cultivar e caracterizar morfologicamente o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* por meio de microcultivo;
- Verificar a ação de diferentes polissacarídeos e do óleo das sementes de copaíba sobre o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (*in vitro*);
- Cultivar plantas de feijão-caupi e investigar o potencial do polissacarídeo xiloglucana, bem como seus oligossacarídeos, em atuarem como indutores de proteção contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (*in vivo*);
- Avaliar o efeito da concentração da xiloglucana extraída das sementes de copaíba sobre a capacidade de conferir proteção à planta contra o fungo (*in vivo*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO XILOGLUCANA

As sementes de copaíba e jatobá foram adquiridas no IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, São Paulo). As sementes destas espécies foram primeiramente submetidas à fervura em água destilada durante 30 minutos, para inativação enzimática. As sementes permaneceram nesta água por 24 h e a seguir seu tegumento foi retirado manualmente. Os cotilédones isolados foram secos em estufa a vácuo e moídos em moinho WILLYE TE-650. As sementes sofreram deslipidificação com tolueno-etanol (2:1) por 72 h, em aparelho extrator Soxhlet.

4.1.1 Extração das xiloglucanas de reserva

O material deslipidificado e seco foi submetido à extração aquosa de uma hora a temperatura ambiente utilizando agitador mecânico. As soluções obtidas a partir das extrações foram centrifugadas a 10.000 RPM durante 20 minutos. Os sobrenadantes foram precipitados em etanol (2 V) e os resíduos armazenados em congelador. Os materiais precipitados no etanol foram separados por centrifugação (10.000 RPM, 20 minutos), lavados duas vezes com etanol absoluto e secos em estufa a vácuo. O sobrenadante etanólico da copaíba foi concentrado em rotaevaporador, congelado, liofilizado e reservado para investigar a presença de oligossacarídeos naturais.

4.1.2 Determinação da composição monossacarídica

Os polissacarídeos obtidos a partir da extração aquosa das sementes de copaíba e jatobá foram submetidos à hidrólise ácida com H_2SO_4 72 % (p/p) por uma hora, em banho de gelo. O material foi diluído para 8% de H_2SO_4 e aquecido a 120 °C durante 14 horas. A solução foi neutralizada com BaCO_3 e filtrada (BIERMANN, 1989). O filtrado foi reduzido com NaBH_4 a 25 °C (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Em seguida foi adicionado ao material resina catiônica Lewatit S-100 para a

remoção dos íons sódio (Na^+) e para decompor o excesso do agente redutor. Posteriormente, o material foi filtrado, evaporado até a secura e lavado três vezes com metanol, para a remoção do ácido bórico remanescente, na forma de borato de trimetila. Após secagem, os alditóis sofreram acetilação com piridina-anidrido acético (1:1 v/v) por 24 h a temperatura ambiente (25 °C) (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Esta reação foi interrompida com a adição de gelo moído e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual na fase clorofórmica foi eliminada com sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% e água destilada de forma intercalada. A fase clorofórmica foi lavada diversas vezes com água destilada, evaporada a 25°C para posterior análise por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

Para as análises de GLC foi utilizado um cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890 All, equipado com detector de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 2 ml/min. Utilizou-se uma coluna capilar [30 m x 0,25 mm (d.i.)] DB-225, com espessura de filme de 0,25 mm, temperatura do detector de 300 °C e do injetor de 250 °C.

4.1.3 Dosagens colorimétricas

As dosagens de açúcar total foram realizadas pelo método de fenol – ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando padrão de glucose em concentrações de 20-100 µg/ml e leitura realizada em comprimento de onda de 490 nm.

As dosagens de proteína foram realizadas pelo método de Hartree (1972), usando como padrão albumina bovina nas concentrações de 20-100 µg/ml e leitura realizada em comprimento de onda de 650 nm.

4.1.4 Análise por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) acoplada a detectores de espalhamento de luz laser multiângulos (MALLS) e índice de refração (RI)

As amostras de xiloglucanas, extraídas de copaíba e jatobá, foram solubilizadas em solução de NaNO_2 0,1 M contendo 200 ppm de NaN_3 para obter como concentração polissacarídica final de 2 mg/ml. Em seguida, foram filtradas

através de membranas de acetato de celulose de 0,22 μm . As análises foram efetuadas em um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de índice de refração (RI) diferencial WATERS modelo 2410 e com um detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP, com 18 canais acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 . O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_2 0,1 M contendo NaN_3 200 ppm a 25 °C, com fluxo de 0,6 ml/min, pressão de 920 psi, monitorados por bomba peristáltica WATERS 515. A massa molar média (M_w) das xiloglucanas foi determinada através do método de espalhamento de luz. Para cálculo da massa molar foi determinada a variação do índice de refração com a concentração (dn/dc) e utilizada a equação de Rayleigh-Debye-Gans. Os cálculos foram efetuados utilizando o programa ASTRA.

4.2 OBTENÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE COPAÍBA

A xiloglucana extraída das sementes de copaíba foi digerida com enzima celulase (endo-CELLULASE – EGII) Megazyme-Lote 51101. A xiloglucana foi solubilizada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 na concentração de 3 mg/ml, a enzima (6 U/ml de solução) foi adicionada e deixada reagir por 24 h a 37 °C. A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C por 5 minutos. Após resfriamento para temperatura ambiente, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 15.000 RPM a 5 °C, a fim de separar a enzima. Ao sobrenadante foi adicionado etanol (3 V) para precipitação do polissacarídeo não hidrolisado, o qual foi separado por centrifugação. O novo sobrenadante foi concentrado em evaporador a vácuo, congelado e liofilizado.

Para confirmar a presença de oligossacarídeos nas amostras obtidas, tanto enzimaticamente como os oligossacarídeos naturais, foi realizada uma cromatografia em camada delgada, utilizando placa de sílica gel Merck (10x10 cm). Foram utilizados como padrões os monossacarídeos glicose, xilose e galactose e o dissacarídeo maltose.

A mistura acetato de etila – n-propanol – ácido acético – água (4:2:2:1 v/v) foi utilizada como fase móvel e a revelação foi feita utilizando solução de orcinol- H_2SO_4 , seguido de aquecimento a 100°C.

4.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO DAS SEMENTES DE COPAÍBA

As sementes de copaíba foram moídas com a casca, em moinho WILEY MILL modelo nº3, e em seguida, sofreram deslipidificação com éter etílico por 24 horas, em aparelho extrator de Soxhlet. O éter remanescente foi removido do óleo de copaíba extraído, por evaporação a vácuo a 35 °C, seguindo o método utilizado por Stupp *et al.* (2008).

4.4 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VIVO*

4.4.1 Cultivo da planta hospedeira

As sementes do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), adquiridas no mercado, foram desinfectadas utilizando hipoclorito de sódio a 0,05% de acordo com Barreto *et al.* (2006). Em seguida as sementes foram plantadas e mantidas em casa de vegetação, gentilmente cedida pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná.

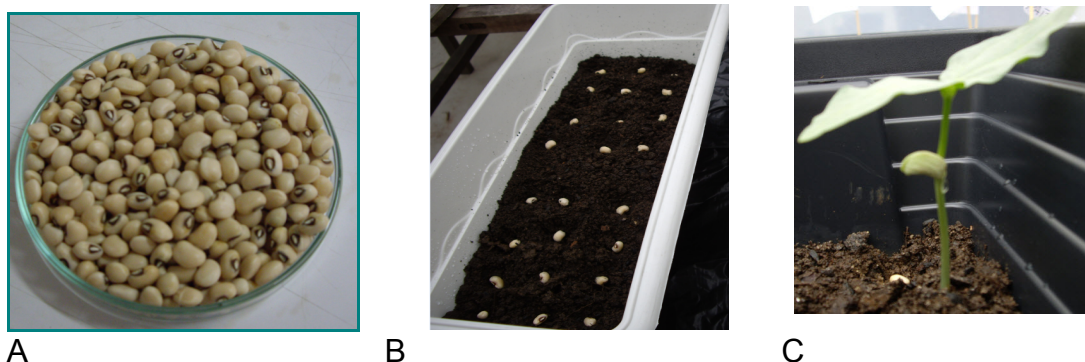


Figura 4.1 – Sementes e planta jovem de *Vigna unguiculata*.

NOTA: A - Sementes do feijão-caupi; B - Sementes plantadas nos vasos em casa de vegetação; C: Planta jovem com sete dias.

Em cada vaso foram plantadas aproximadamente 25 plantas. Para cada tratamento foram utilizadas cerca de 10 plantas, sendo que em cada vaso, dois tratamentos foram realizados. As plantas foram mantidas em temperatura média de 30 °C.

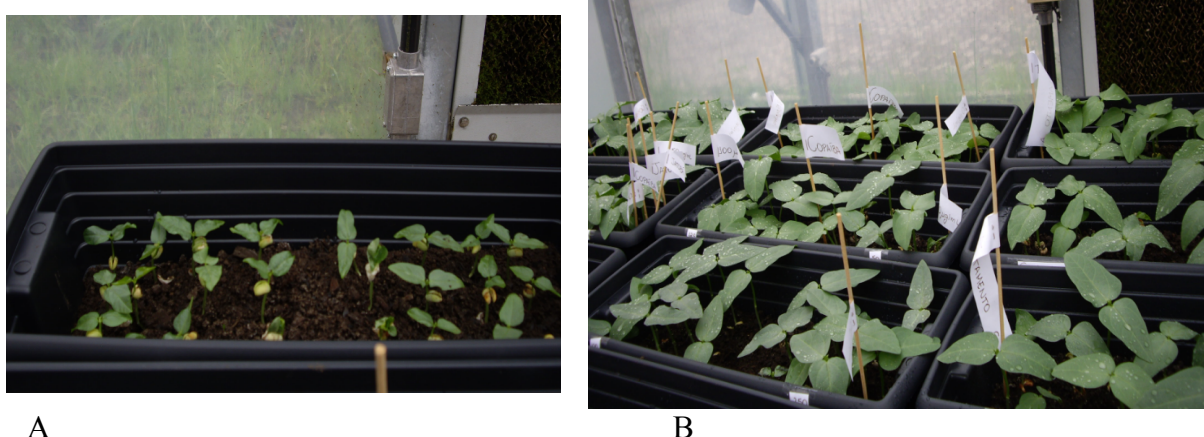


Figura 4.2 – Plantas de *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) em casa de vegetação.

NOTA: A - Plantas com 7 dias; B - Plantas com 14 dias.

FONTE: O autor (2009).

4.4.2 Obtenção e cultivo de *Colletotrichum gloeosporioides*

O fungo *C. gloeosporioides*, foi identificado e cedido gentilmente pelo LabGeM - Laboratório de Genética de Micro-organismos, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. O fungo foi mantido em meio batata-dextrose-ágar (BDA) por 20 dias, em estufa incubadora B.O.D a 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

A confirmação da identificação de *C. gloeosporioides* foi feita por meio de análise das características macromorfológicas (aspecto da colônia, verso e reverso) e também micromorfológicas, por meio de microcultivo (KERN; BLEVIS, 1999). Placas de Petri com uma lâmina e um pedaço de algodão foram esterilizadas em autoclave por 40 minutos sob pressão de 1 atm e temperatura de 121 °C. Um cubo de aproximadamente 1 cm³ de meio de cultura BDA foi cortado e colocado sobre a lâmina contida no interior da placa. Repicou-se o isolado nos quatro lados do cubo, o qual foi posteriormente coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior

foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa foi incubada em estufa por 7 a 14 dias, a aproximadamente 28 °C. Após o tempo determinado, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de Lactofenol de Amann, sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. As lâminas preparadas foram observadas ao microscópio óptico.

4.4.3 Preparação do inóculo para aplicação nas plantas

Foram preparados 150 ml de solução de esporos para aplicar nas plantas. A concentração de esporos na solução foi estimada em câmara de Neubauer em $1,08 \times 10^7$ esporos/ml.

4.4.4 Preparo das soluções para aplicação nas plantas

Foram utilizadas quatro substâncias-teste como indutores de proteção no feijão-caupi contra o fungo *C. gloeosporioides*.

TABELA 4.1 – LISTA DOS INDUTORES UTILIZADOS NAS PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES

Substância-teste	Concentração (µg/mL)
Xiloglucana de Copaíba	12,5
	50
	100
	250
	500
	1000
Xiloglucana de Jatobá	500
Oligossacarídeos Naturais ¹	500
Oligossacarídeos Enzima ²	250

NOTA: ¹Oligossacarídeos provenientes do extrato etanólico da precipitação das xiloglucanas de copaíba. ²Oligossacarídeos obtidos após digestão enzimática da xiloglucana de copaíba.

4.4.5 Montagem do experimento

Plantas com 21 dias foram utilizadas para avaliar o efeito da concentração da xiloglucana extraída das sementes de copaíba, em conferir proteção à planta contra o fungo *C. gloeosporioides*. As plantas também foram submetidas a testes de proteção sistêmica e local, seguindo a metodologia de GUZZO *et al.* (1993) com algumas modificações.

Antes da aplicação dos indutores, a superfície superior das folhas foi aspergida com água da torneira e em seguida com água destilada estéril. Posteriormente a superfície das folhas foi seca delicadamente com algodão.

Em todos os testes, o indutor foi aplicado somente no par de folhas primárias das plantas, embora algumas delas já apresentassem outras folhas além destas. Como todas as plantas possuíam ao menos o par de folhas primárias, este foi escolhido para realização dos testes. Após 72 horas da aplicação do indutor, o patógeno foi aplicado.

4.4.6 Ensaio de proteção local

a) Avaliação da capacidade das xiloglucanas de atuarem como indutoras de resistência

A xiloglucana extraída das sementes de copaíba, nas concentrações de 12,5, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/ml, foi aplicada na superfície superior do par de folhas primárias do feijão-caupi, com auxílio de um borrifador e 72 horas depois, o fungo foi borrifado na mesma superfície na qual o indutor havia sido aplicado. Estas plantas permaneceram em uma sala com temperatura média de 27 °C. Foram criados dois grupos controle: um deles recebeu água ao invés de indutor e no outro não foi inoculado o fungo.

A xiloglucana de jatobá também foi testada neste experimento, mas somente uma concentração intermediária (500 µg/ml) foi escolhida para a realização do teste, devido ao espaço limitado para o cultivo das plantas. Foi utilizado o mesmo

procedimento do experimento anterior.

Após quinze dias da aplicação do fungo, quando os sintomas da doença já estavam bastante avançados, as plantas foram analisadas quantificando-se o número de folhas afetadas e sadias por grupo de tratamento. As folhas amareladas ou com pontos de necrose foram consideradas como afetadas, as folhas sadias não apresentavam nenhum sintoma da doença. Foi quantificado também o número de folhas que as plantas perderam em decorrência da doença, em relação ao número total de folhas inoculadas, por tratamento.

b) Avaliação da capacidade da mistura de oligossacarídeos naturais e obtidos por hidrólise enzimática da xiloglucana de copaíba de atuarem como indutores de resistência

Os oligossacarídeos provenientes da hidrólise enzimática da xiloglucana de copaíba e também os oligossacarídeos naturais obtidos na extração aquosa das sementes foram utilizados no ensaio de proteção local. A solução de oligossacarídeos da hidrólise foi utilizada na concentração de 250 µg/ml e a solução de oligos- naturais 500 µg/ml.

4.4.7 Ensaio de proteção sistêmica

Para o teste de proteção sistêmica foi utilizada a xiloglucana de copaíba na concentração de 500 µg/ml. Neste tratamento, a aplicação do polissacarídeo indutor foi realizada em uma folha da planta, sendo esta marcada, e após 72 horas esta folha foi retirada da planta e a inoculação do patógeno foi executada somente na folha oposta. O grupo controle foi tratado com água destilada esterilizada ao invés do indutor, seguindo o método utilizado por GUZZO *et al.* (1993)

4.5 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VITRO*

As xiloglucanas extraídas das sementes de copaíba e jatobá foram testadas quanto à sua ação sobre o crescimento do fungo *C. gloeosporioides in vitro*.

Além destes polissacarídeos também foram testados o óleo extraído das sementes de copaíba e dois polissacarídeos fornecidos pelo Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais, um deles proveniente do exsudato dos frutos da *Chorisia speciosa* (paineira) e outro obtido por extração aquosa das sementes de *Hyptis fruticosa*.

Foram utilizados dois métodos diferentes neste ensaio *in vitro*: o método de difusão em disco de papel e o método da difusão em meio sólido.

4.5.1 Método da difusão em disco de papel

Através deste método foi testada a ação de três substâncias sobre o crescimento micelial do patógeno *C. gloeosporioides*: soluções esterilizadas das xiloglucanas extraídas das sementes de jatobá e copaíba, além do óleo obtido da deslipidificação da copaíba (Tabela 4.2). O método utilizado neste experimento foi adaptado de Carvalho *et al.* (2002).

No teste com a xiloglucana extraída das sementes de jatobá, a concentração de esporos utilizada foi estimada utilizando câmara de Neubauer ($3,8 \times 10^7$ esporos/ml). Em placas de Petri contendo meio BDA foram adicionados 100 μ l da solução de esporos em solução fisiológica 0,85%, os quais foram distribuídos uniformemente sobre toda a placa, com o auxílio de um swab estéril. No centro da placa, foi adicionado um disco de papel filtro autoclavado com diâmetro de 28 mm, imerso nas soluções de diferentes concentrações do polissacarídeo.

TABELA 4.2 – CONCENTRAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS TESTADAS QUANTO A CAPACIDADE DE INIBIR O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum gloeosporioides* IN VITRO PELO MÉTODO DA DIFUSÃO EM DISCO DE PAPEL

XG – jatobá (μ g/mL)	XG – copaíba (μ g/mL)	Óleo copaíba
200	50	4,0%
500	1000	
1000	2000	

NOTA: XG: Xiloglucana.

Após a montagem do experimento, as placas foram mantidas em estufa a 28 °C, durante 5 dias, quando foi avaliado o resultado. O experimento foi realizado em triplicata.

O teste com a xiloglucana de copaíba seguiu os mesmos padrões já citados acima, exceto pelas concentrações de xiloglucana utilizadas, que neste caso foram 50, 1000 e 2000 ug/ml. A concentração de esporos usada neste experimento foi menor: $7,1 \times 10^6$ esporos/ml.

O óleo extraído das sementes de copaíba foi solubilizado em solução de Tween 80 (0,8%) na concentração de 4%. Para o grupo controle, os discos de papel filtro foram imersos na solução de Tween 80, sem a adição do óleo. A concentração de esporos estimada para este experimento foi de $9,7 \times 10^6$ esporos/ml.

Para o controle negativo foi utilizado água destilada esterilizada e para o controle positivo, hipoclorito de sódio a 2,5%.

4.5.2 Método da difusão em meio sólido

A ação das xiloglucanas extraídas das sementes de copaíba e jatobá sobre o crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi testada também pelo método da difusão em meio sólido, seguindo o método descrito por Araújo *et al.* (2004) com algumas adaptações.

A ação antifúngica do óleo extraído das sementes de copaíba, dos polissacarídeos do exsudato de *Chorisia speciosa* (paineira) e das sementes de *Hyptis fruticosa* (alecrim-do-campo) também foram testados por este método. O óleo da copaíba, solubilizado em Tween 80 (0,8%), foi diluído para as concentrações finais de 4, 2 e 1%. O solvente dimetilsulfóxido 50% também foi utilizado para solubilizar o óleo.

As concentrações das soluções utilizadas estão demonstradas na tabela 4.3. Em placas contendo meio BDA, foram realizadas cavidades com aproximadamente 6 mm de diâmetro. Em seguida, 500 ul da solução de esporos, na concentração de $1,0 \times 10^7$ esporos/ml, foi distribuída nas placas com o auxílio de swab estéril, a fim de produzir um crescimento uniforme. Nas cavidades realizadas nas placas de Petri, foram adicionados 50 ul das soluções das substâncias a serem testadas,

inclusive as soluções controle: água, os solventes Tween e dimetilsulfóxido (controle negativo) e hipoclorito de sódio 2,5% como controle positivo.

TABELA 4.3 – CONCENTRAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS TESTADAS QUANTO A CAPACIDADE DE INIBIR O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum gloeosporioides* IN VITRO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO

Exsudato Paineira (µg/ml)	XG – jatobá (µg/ml)	XG – copaíba (µg/ml)	Óleo copaíba (%)
50	50	50	4,0
100	100	100	2,0
500	500	500	1,0
1000	1000	1000	
2000	2000	2000	

As placas foram mantidas em estufa a 28 °C por 14 dias, quando foi analisado o efeito das substâncias testadas sobre o crescimento micelial do fungo.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação da capacidade dos polissacarídeos e oligossacarídeos agirem como indutores de proteção no feijão-caupi foi realizada pela quantificação do número de folhas afetadas e sadias por grupo em relação ao total de folhas primárias presentes por tratamento.

Para testar a hipótese de que a porcentagem de plantas sadias nos grupos tratados foi devido ao tratamento e não apenas ao acaso, foi utilizado o teste z que verifica se duas probabilidades são iguais, ou seja, se a probabilidade de as plantas estarem sadias nos grupos tratados é a mesma fazendo o tratamento ou não.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

As xiloglucanas de reserva obtidas a partir da extração aquosa da copaíba e jatobá corresponderam a 12,6% e 16,5%, respectivamente, do peso seco dos cotilédones secos e deslipidificados. Segundo Buckeridge e Dietrich (1990) estas plantas armazenam cerca 45% da massa seca de seus cotilédones como xiloglucana de reserva. Os rendimentos elevados são obtidos quando se utilizam extrações seqüenciais exaustivas, entretanto neste trabalho optou-se por uma única extração de uma hora visando a obtenção de frações com maior grau de pureza. A extração exaustiva dos cotilédones para obtenção de xiloglucanas resulta na co-extração de proteínas e outros polissacarídeos.

Os resultados das dosagens colorimétricas demonstram o alto teor de carboidratos presente nas sementes de copaíba e jatobá e a pequena proporção de proteínas (Tabela 5.1).

TABELA 5.1 – CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS DOS EXTRATOS AQUOSOS DAS SEMENTES DE COPAÍBA E JATOBÁ

	Jatobá	Copaíba
Açúcar total ¹ (%)	91,8	96,0
Proteína ² (%)	4,0	2,0

(1) Método de Dubois *et al.* (1956);

(2) Método de Hartree (1972).

A análise da composição monossacarídica das frações obtidas por extração aquosa das sementes de copaíba e jatobá mostrou a presença de glucose como componente majoritário, seguido de xilose e galactose (Tabela 5.2) confirmando a presença de xiloglucanas.

TABELA 5.2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS AMOSTRAS OBTIDAS POR EXTRAÇÃO AQUOSA DAS SEMENTES DE COPAÍBA E JATOBÁ

	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA ^a				
	MOL (%)				
	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Copaíba	1,0	30,6	----	19,2	49,2
Jatobá	1,0	33,1	0,6	14,2	50,9

(a) Açúcares neutros analisados por GLC, na forma de acetatos de alditóis.

A xiloglucana de jatobá apresentou uma proporção de Glc:Xyl:Gal de 4,0:2,6:1,1, semelhante aos valores descritos na literatura para o mesmo polímero (Buckeridge *et al.*, 1997).

Para a copaíba, a xiloglucana obtida apresentou uma proporção de Glc:Xyl:Gal de 4,0:2,5:1,6, semelhante aos valores encontrados por Buckeridge *et al* (1992) que foram de 4,0:2,8:1,5 e 4,0:2,7:1,7 dependendo da origem da semente.

A análise por HPSEC-MALLS/RI das xiloglucanas confirma a existência de amostras homogêneas, devido ao perfil unimodal encontrado, com os picos do índice de refração e espalhamento de luz laser em multiângulos, sendo coincidentes (Figuras 5.1 e 5.2).

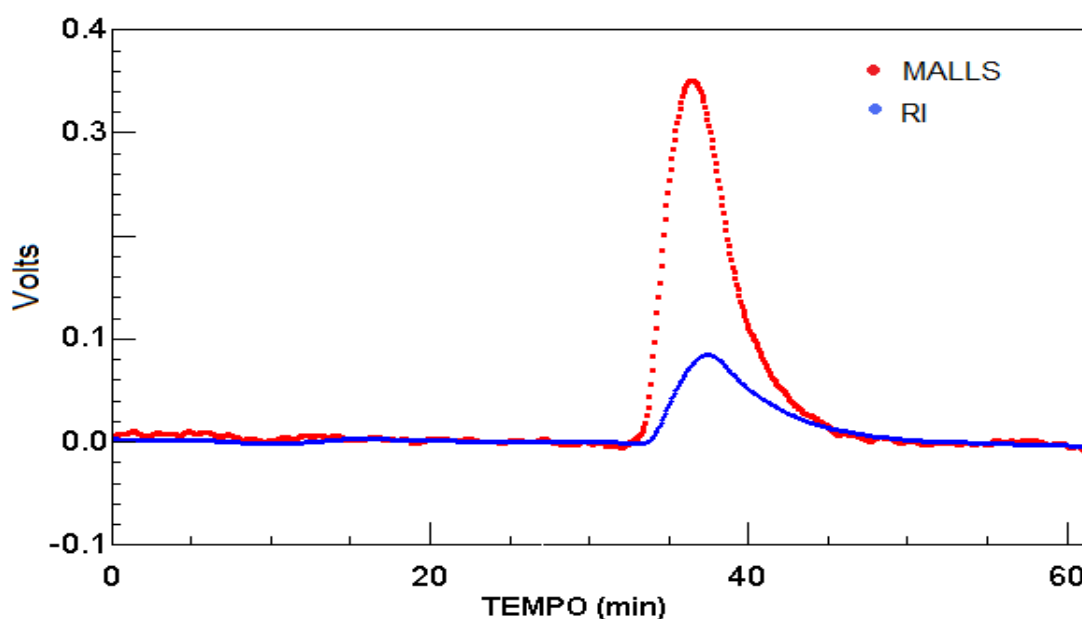


Figura 5.1 - Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI para a xiloglucana obtida das sementes de copaíba.

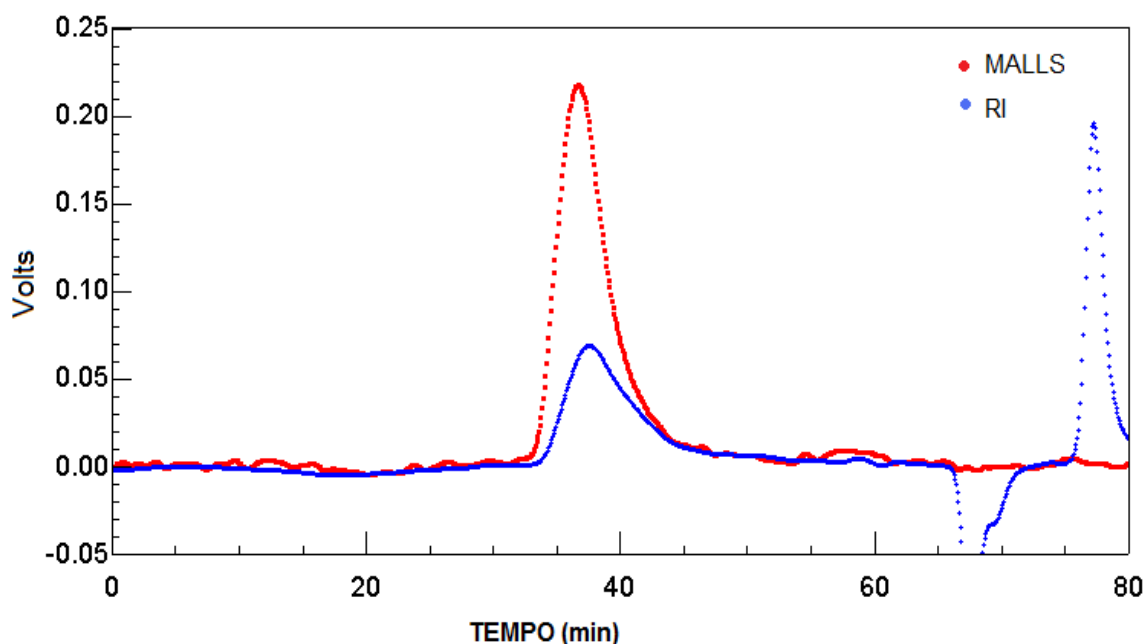


Figura 5.2 - Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI para a xiloglucana obtida das sementes de jatobá.

Foram determinados os valores das massas molares médias (M_w) para as xiloglucanas, sendo encontrado um valor de M_w de $8,48 \times 10^5$ g/mol, com erro de 2,0%, para a xiloglucana de jatobá e índice de polidispersão (M_w/M_n) de $1,002 \pm 0,028$. Para a xiloglucana extraída das sementes de copaíba, o M_w encontrado foi de $7,48 \times 10^5$ g/mol, com erro de 2,0% e um índice de polidispersão de $1,28 \pm 0,036$. Os cálculos foram efetuados utilizando o modelo de Debye.

A massa molar encontrada para a xiloglucana de copaíba é muito semelhante à encontrada por Stupp *et al.* (2007), que determinaram um valor de M_w de $7,82 \times 10^5$ g/mol para a mesma espécie.

Freitas *et al.* (2005) estudaram as propriedades físico-químicas de xiloglucanas de sementes de jatobá de diferentes regiões do Brasil. As massas molares (M_w) destas amostras variaram de $2,2 \times 10^6$ g/mol até $8,5 \times 10^5$ g/mol, sendo este último resultado muito semelhante ao encontrado para a xiloglucana de jatobá do presente estudo.

A xiloglucana de copaíba foi tratada com celulase para obtenção de uma mistura de oligossacarídeos. O produto da ação da enzima e o sobrenadante etanólico da precipitação da xiloglucana foram investigados por cromatografia de camada delgada. Os resultados estão mostrados na figura 5.3.

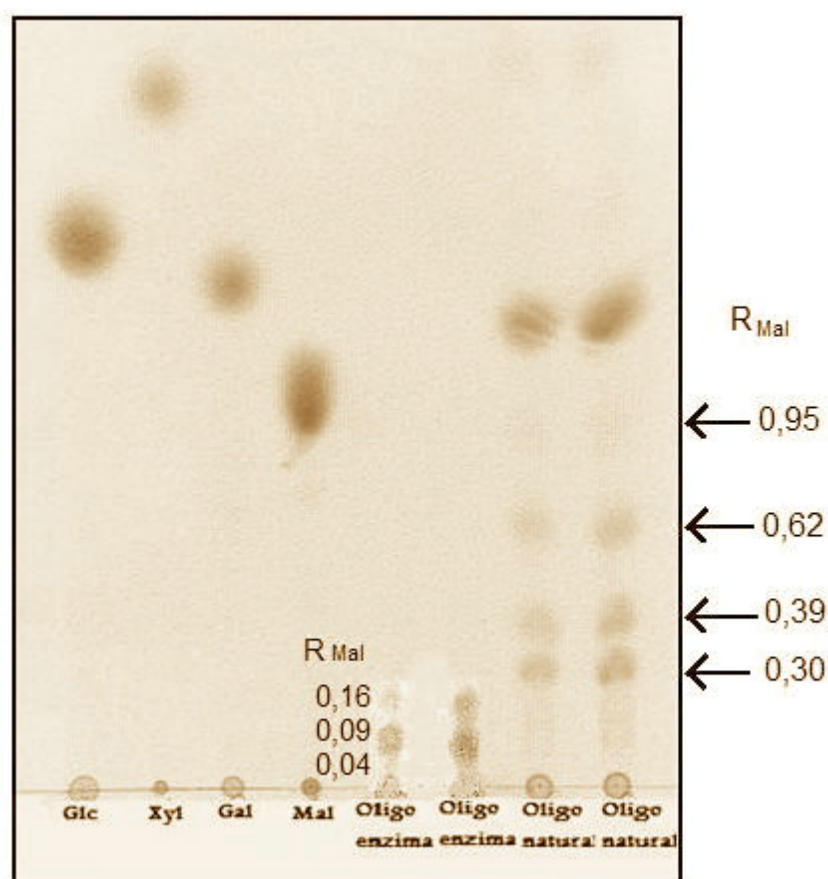


Figura 5.3 – Cromatografia em camada delgada das amostras de oligossacarídeos naturais e os obtidos enzimaticamente.

NOTA: Mal – Dissacarídeo maltose

O cromatograma confirma a presença de oligossacarídeos com R_{Mal} de 0,04, 0,09 e 0,16 no material proveniente do tratamento enzimático da xiloglucana. De acordo com a literatura os oligossacarídeos obtidos pertencem principalmente a série XXXG, sendo XLG o principal (BUCKERIDGE *et al.*, 1992).

Para o sobrenadante etanólico proveniente da precipitação da xiloglucana, além da presença de monossacarídeos livres (R_{Mal} = 1,16, 1,34 e 1,66), também foram detectados oligossacarídeos (R_{Mal} = 0,30, 0,39, 0,62 e 0,95). A identidade

destes oligossacarídeos deverá ser investigada em estudos futuros.

Devido a informações da literatura relacionadas a frações lipídicas com atividade antimicrobiana, decidiu-se isolar a fração lipídica das sementes de copaíba e utilizá-la para os ensaios biológicos.

Neogi *et al.* (2008) estudaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de óleos extraídos de dez sementes de plantas medicinais da Índia. Todas as linhagens bacterianas demonstraram algum grau de sensibilidade aos lipídeos das sementes testadas. Os ácidos graxos naturais isolados das sementes apresentaram uma moderada atividade antifúngica e antibacteriana. Segundo os autores, a propriedade antifúngica dos ácidos graxos é devida à ação como detergente, a qual afeta a estrutura e permeabilidade das membranas celulares destes organismos.

Lipídeos de origem animal também apresentaram função antimicrobiana. Ravichandran *et al.* (2009) estudaram a atividade da hemolinfa (plasma) e de hemócitos de siris sobre dezesseis linhagens microbianas. Os extratos de hemolinfa testados, foram capazes de inibir o crescimento de diversas linhagens patogênicas, inclusive a do vibrião da cólera. A partir de análises bioquímicas, os autores concluíram que a atividade antimicrobiana dos extratos da hemolinfa é devida à presença de lipídeos nestas amostras.

A composição do óleo extraído das sementes de copaíba com éter etílico já foi descrita por Stupp *et al.* (2009). A análise da composição dos ácidos graxos deste óleo revelou que 43,5% é ácido linoléico, 31% oléico e 12,7% ácido palmítico, sendo 32,3% monoinsaturados e 45% poliinsaturados e 22,4% saturados. Para cada 1 g de sementes de *C. langsdorffii* foram encontrados $250,1 \pm 6,57$ mg de cumarina entre outros compostos fenólicos também detectados por cromatografia líquida (STUPP *et al.*, 2008).

Vários autores já relacionaram atividades biológicas às cumarinas, tais como antimicrobiana (SARDARI *et al.*, 1999) e anti-HIV (MAO *et al.*, 2002).

Neste trabalho a extração do óleo de copaíba foi efetuada de acordo com Stupp *et al.* (2009) visando obter um material semelhante ao já descrito por estes autores.

Além dos compostos já mencionados, foram utilizados nos experimentos biológicos um polissacarídeo de exsudato dos frutos maduros de *Chorisia speciosa*

(paineira), estudado anteriormente por Beleski-Carneiro, Ganter e Reicher (1999) e um polissacarídeo obtido por extração aquosa das sementes de *Hyptis fruticosa* (alecrim-do-campo).

O polissacarídeo do exsudato possui uma cadeia principal composta por unidades de β -galactopiranoses ligadas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6), a qual apresenta arabinose e ramnose, como unidades terminais não-redutores (BELESKI-CARNEIRO; GANTER; REICHER, 1999). A estrutura do polissacarídeo das sementes de *Hyptis fruticosa* está sendo investigada pelo Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO *Colletotrichum gloeosporioides*

A morfologia da colônia em placa de Petri confirma que o fungo cultivado é o *Colletotrichum gloeosporioides*, pois segundo Freeman, Katan e Shabi (1998) a coloração da colônia *in vitro* varia de branca a cinza escuro e de acordo com Bailey (1992) o fungo produz uma massa alaranjada de conídios, a qual pode ser observada ao redor da colônia (Figura 5.4).

1



2

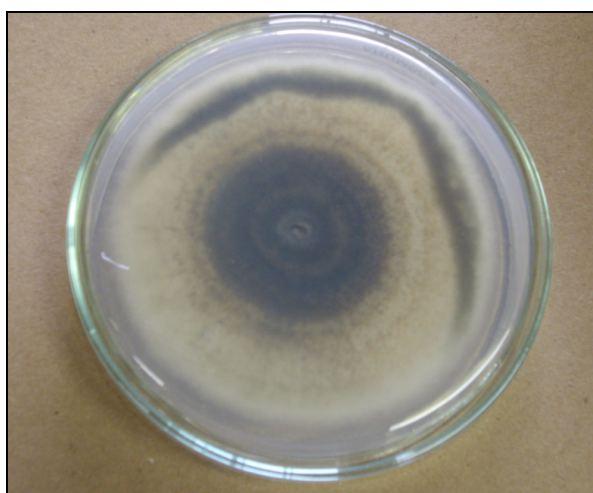


Figura 5.4 – Morfologia macroscópica de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio BDA, após 14 dias a 28 °C.

NOTA: 1. Verso da colônia 2. Reverso da colônia.

As imagens obtidas do microcultivo do fungo (Figuras 5.5 e 5.6) também confirmam a identidade do patógeno como *C. gloeosporioides* devido a presença de um micélio com hifas bastante espessas e coradas, formato elipsóide dos conídios hialinos com as extremidades arredondadas, além da existência de apressórios bastante melanizados, característicos do patógeno (EMBRAPA, 2004).

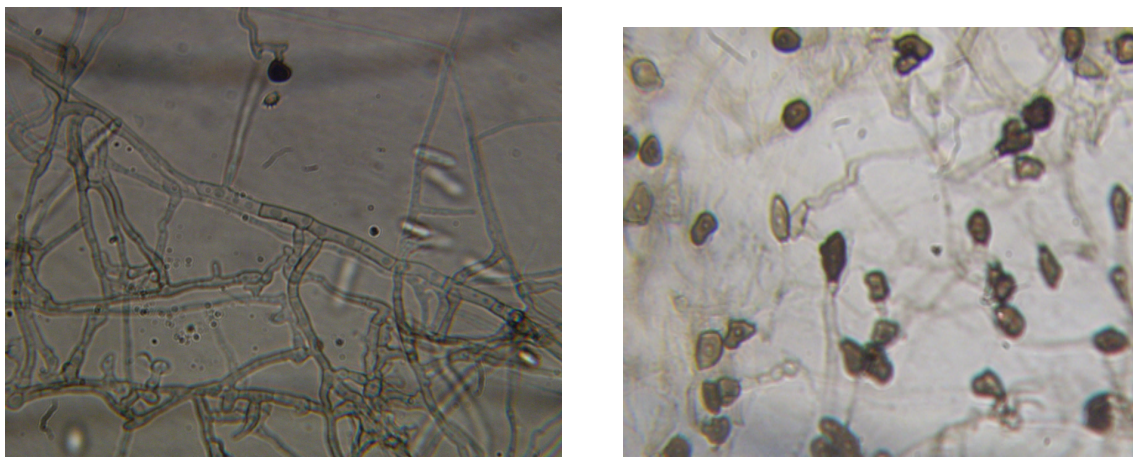


Figura 5.5 – Micromorfologia de *Colletotrichum gloeosporioides* ao microscópio óptico, aumento 400x.

NOTA: A - Micélio do fungo; B - Conídios germinados com apressórios melanizados.

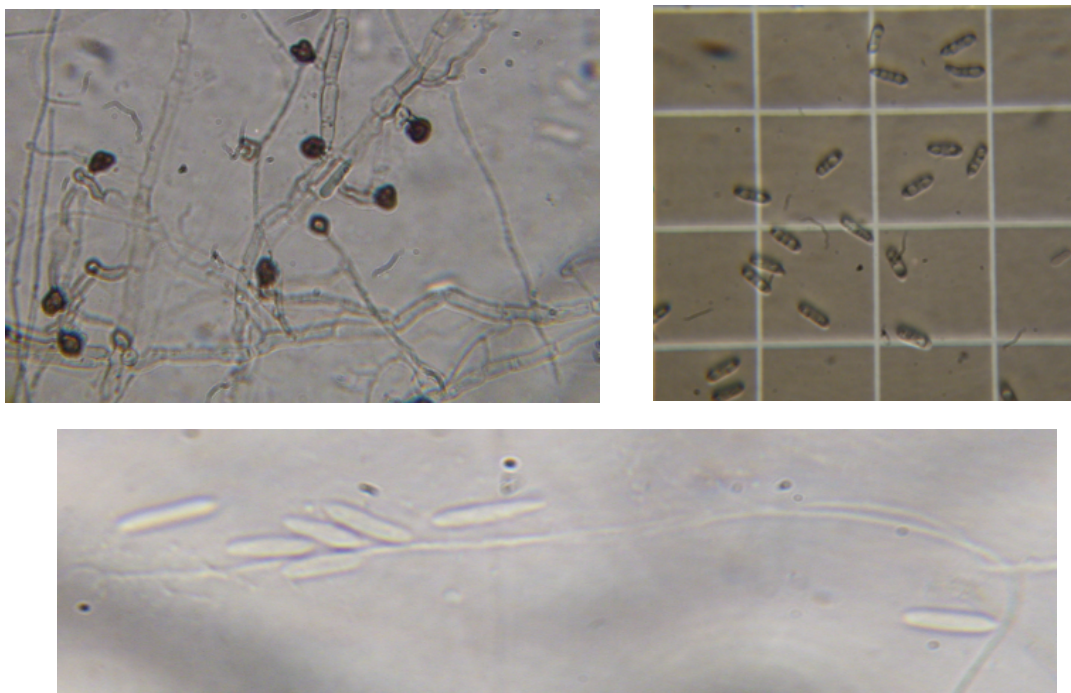


Figura 5.6 – Micromorfologia de *Colletotrichum gloeosporioides* ao microscópio óptico,

aumento 400x.

NOTA: A - Micélio do fungo e apressórios; B - Conídios em câmara de Neubauer;

C - Conidióforo apresentando conídios aderidos.

5.3 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VIVO*

Após quatro dias da inoculação do fungo as folhas primárias das plantas já apresentavam pontos escuros de necrose. As plantas do controle negativo que não receberam a inoculação do fungo continuaram sadias durante todo o experimento, sem nenhuma folha com pontos de necrose. Além disso, no isolamento de folhas com sintomas da doença foi observado o fungo *Colletotrichum* emergindo das lesões e do pecíolo. Prusky² *et al.* (2000, apud Nguyen *et al.*, 2009) afirma que os sintomas característicos da doença antracnose são as lesões necróticas profundas.

Decorrida uma semana da inoculação do fungo, 23% das plantas do controle apresentavam-se afetadas pela doença. As plantas tratadas com os oligossacarídeos naturais e com as xiloglucanas de copaíba nas concentrações de 50, 500 e 1000 µg/ml apresentavam todas as folhas sadias, sem sintomas da doença.

A



B



Figura 5.7 - Folhas afetadas com a doença antracnose após duas semanas da aplicação do patógeno.

NOTA: A - Folha afetada, amarelada e com pontos de necrose; B - Detalhe da lesão em lupa, aumento: 20x.

Após quinze dias da aplicação do fungo, muitas plantas encontravam-se afetadas, com sintomas da doença. Algumas perderam as folhas, outras

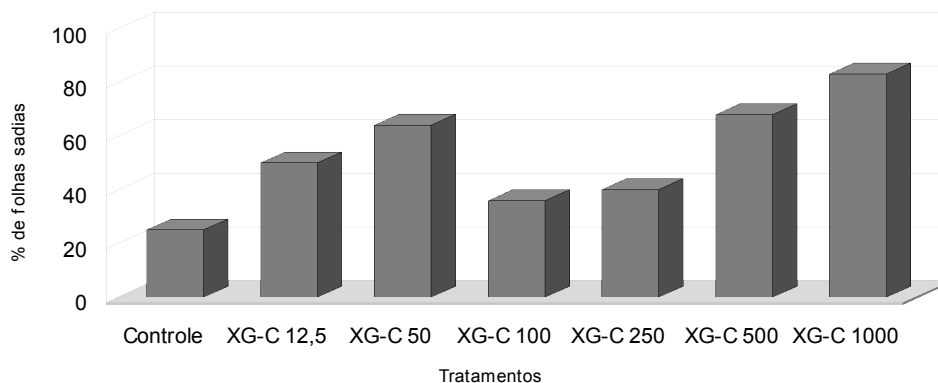
² PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMANMB. *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. St Paul, MN, USA: APS Press, 2000.

apresentavam-se completamente amareladas e outras permaneciam verdes, mas com pontos de necrose, sendo este um estágio inicial da doença. Estes três níveis da doença, foram incluídos na classe de folhas afetadas. As folhas sadias não apresentavam nenhuma evidência da doença.

a) Avaliação do efeito da concentração da xiloglucana de copaíba na capacidade de proteção da planta

Analizando a porcentagem de plantas sadias no grupo controle e nas plantas tratadas com diferentes concentrações da xiloglucana de copaíba é possível verificar que houve um aumento do percentual de plantas sadias nos grupos tratados com a xiloglucana. A porcentagem de proteção conferida às plantas pelo polissacarídeo na concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ foi de aproximadamente 60%, sendo que não houve diferença significativa entre este tratamento e a concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$. Também não houve diferença significativa entre os tratamentos com 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ da xiloglucana de copaíba. Assim, o polissacarídeo em baixa concentração já se mostra capaz de promover uma proteção eficaz na planta. No entanto, as concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g/ml}$ apresentam baixa eficácia. Devido a esses dois tratamentos terem sido realizados no mesmo vaso de planta, é possível que alguma interferência externa possa ter influenciando este resultado. Os resultados obtidos estão mostrados no gráfico 5.1.

GRÁFICO 5.1 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA XILOGLUCANA DE COPAÍBA NA PROTEÇÃO DAS PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI CONTRA O FUNGO *C. gloeosporioides*



NOTA: Porcentagem de folhas sadias em relação ao total de folhas primárias do grupo.

XG-C: Xiloglucana de copaíba. Os números ao lado da sigla XG-C representam a concentração utilizada do polissacarídeo em µg/ml.

O grupo de plantas que foi tratado com a xiloglucana de copaíba na concentração de 12,5 µg/ml apresentou 50% de suas folhas sadias até o 15º dia da aplicação do patógeno. Na concentração de 1000 µg/ml, o percentual de folhas sadias no grupo foi maior, cerca de 80%. O grupo controle apresentou apenas 25% de folhas sadias em relação ao total de folhas do grupo.

Para analisar estatisticamente os dados obtidos, foi utilizado o teste Z, para testar a hipótese de que a porcentagem de plantas sadias nos grupos tratados foi devido ao tratamento e não apenas ao acaso. O nível de significância estabelecido foi de $\alpha = 0,05$, para o qual o valor crítico é de 1,96. O valor de Z é calculado pela diferença entre o resultado do grupo controle e dos tratamentos. Quando o valor de Z é maior que o crítico, se aceita a hipótese inicial na qual se propõe que as folhas sadias encontradas nos grupos são decorrentes do tratamento com o indutor e não apenas devido ao acaso.

O resultado desta análise permitiu afirmar que somente três concentrações da xiloglucana de copaíba protegeram as plantas do patógeno: 50, 500 e 1000 µg/ml. Exceto estes, todos os demais tratamentos não apresentaram capacidade de proteção significativa ao feijão-caupi contra o fungo *C. gloeosporioides*. A porcentagem de proteção proporcionada pelos tratamentos que foram significantes está apresentada na tabela 5.3.

TABELA 5.3 – PORCENTAGEM DE PROTEÇÃO CONFERIDA ÀS PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI PELOS TRATAMENTOS QUE APRESENTARAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DO GRUPO CONTROLE

TRATAMENTO	PROTEÇÃO (%) ¹
XG-C 50	61
XG-C 500	63
XG-C 1000	70

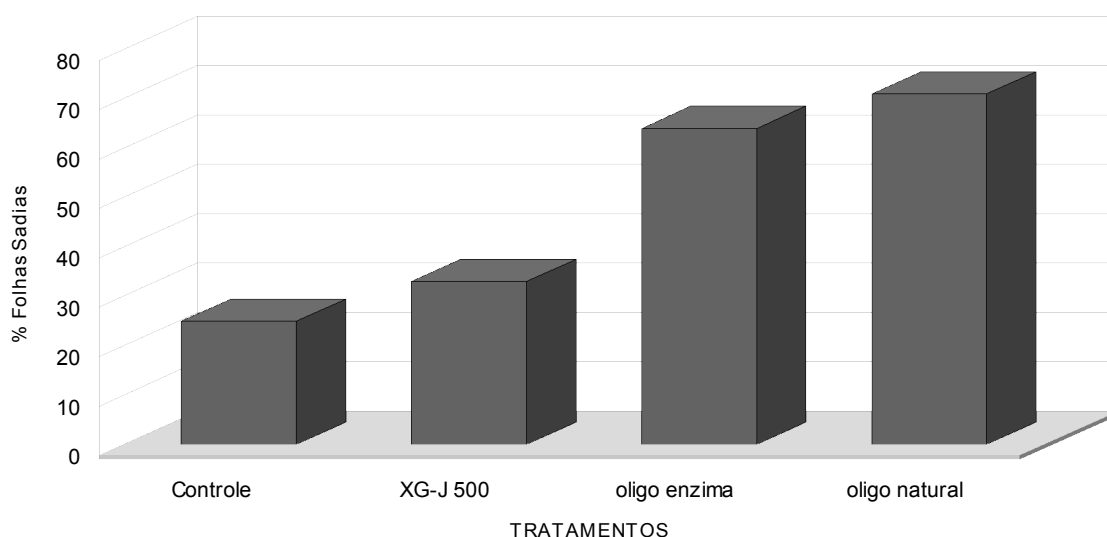
NOTA: XG-C: Xiloglucana de copaíba. Os números ao lado da sigla XG-C representam a concentração utilizada do polissacarídeo em µg/ml.

¹ Porcentagem de proteção conferida às plantas, calculada em relação ao grupo controle.

b) Avaliação da capacidade dos oligossacarídeos de copaíba e da xiloglucana de jatobá em atuar como indutor de resistência

A xiloglucana das sementes de jatobá e a mistura de oligossacarídeos de copaíba (naturais e obtidos por hidrólise enzimática) foram utilizados em testes de proteção local *in vivo*. A xiloglucana de jatobá foi utilizada na concentração de 500 µg/ml, assim como os oligossacarídeos naturais da copaíba. Já a solução dos oligossacarídeos obtidos enzimaticamente foi preparada em 250 µg/ml. O gráfico 5.2 apresenta a porcentagem de folhas sadias em relação ao total de folhas no grupo de tratamento.

GRÁFICO 5.2 - EFEITO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE COPAÍBA E DA XILOGLUCANA DE JATOBÁ NA PROTEÇÃO DAS PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI CONTRA O FUNGO *Colletotrichum gloeosporioides*



NOTA: Porcentagem de folhas sadias em relação ao total de folhas do grupo.

XG-J 500: Xiloglucana de jatobá na concentração de 500 µg/ml; OL-Z 250: Oligossacarídeos obtidos da hidrólise enzimática da copaíba na concentração de 250 µg/ml; OL-N 500: Oligossacarídeos naturais de copaíba na concentração de 500 µg/ml.

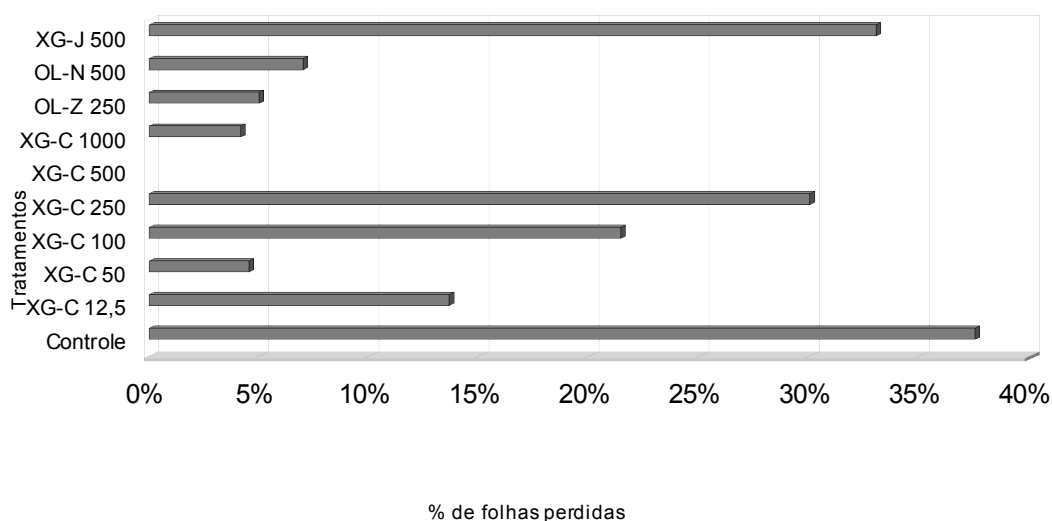
A partir da análise do gráfico pode-se notar que a xiloglucana de jatobá na concentração de 500 µg/ml apresenta mínima diferença do número de folhas sadias

em relação ao controle. Esta diferença não é significativa de acordo com a análise estatística realizada. Já para os tratamentos com os oligossacarídeos da copaíba, foi encontrada uma diferença significativa em relação ao grupo controle. A porcentagem de proteção conferida às plantas pelos oligossacarídeos em relação ao grupo controle foi de 65% para os naturais e 61% para os provenientes da hidrólise enzimática.

c) Avaliação do percentual de queda de folhas nos grupos tratado e controle

A porcentagem de folhas perdidas em relação ao total de folhas primárias de cada grupo também foi analisada (gráfico 5.3). A maior porcentagem de queda foi encontrada no grupo controle, com 38% das folhas perdidas após os quinze dias da inoculação do patógeno. Os tratamentos que apresentaram as maiores taxas de queda, depois do grupo controle, foram aqueles que utilizaram xiloglucana de copaíba na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$ e jatobá de 500 $\mu\text{g/ml}$, com 30 e 33% de queda, respectivamente. Os grupos que apresentaram a menor porcentagem de queda foram aqueles onde utilizou-se concentrações de xiloglucana de copaíba a 50, 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$, sendo que na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$ não houve queda de nenhuma folha. Além destes, os oligossacarídeos de copaíba obtidos enzimaticamente e os naturais apresentaram respectivamente 5,0 e 7,0% de folhas perdidas.

GRÁFICO 5.3 – EFEITO DOS INDUTORES NA PROTEÇÃO CONTRA QUEDA DAS FOLHAS DE FEIJÃO-CAUPI EM DECORRÊNCIA DA ANTRACNOSE



NOTA: Porcentagem de folhas perdidas em relação ao total de folhas do grupo de plantas utilizadas no tratamento.

XG-J 500: Xiloglucana de jatobá na concentração de 500 µg/ml; OL-Z 250: Oligossacarídeos obtidos da hidrólise enzimática da copaíba na concentração de 250 µg/ml; OL-N 500: Oligossacarídeos naturais de copaíba na concentração de 500 µg/ml. XG-C: Xiloglucana de copaíba, seguida da concentração em µg/ml.

c) Teste de Proteção Sistêmica

No teste de proteção sistêmica, no qual a xiloglucana de copaíba (500 µg/ml) foi aplicada em uma folha da planta e 72 horas depois esta foi retirada antes da inoculação do patógeno, o grupo que recebeu tratamento com a xiloglucana apresentou somente 27% das folhas sadias em relação ao total de folhas do grupo. Já no grupo controle, todas as folhas foram afetadas pelo fungo e caíram até o 15º dia da inoculação do fungo. A análise estatística destes dados permite afirmar que a diferença entre o grupo controle e tratado não é significativa e, portanto, a xiloglucana de copaíba não foi capaz de conferir resistência sistêmica à planta nas condições testadas.

Após os testes descritos as plantas foram mantidas para observação. Foi constatado que após três semanas da inoculação do fungo, a doença começou a evoluir rapidamente e se distribuir em toda a planta, inclusive nos grupos tratados, sugerindo que os tratamentos realizados nas plantas apenas retardaram o desenvolvimento da antracnose, não envolvendo a indução de proteção sistêmica da planta.

No estudo de Beleski-Carneiro, Sugui e Reicher (2002) foi observado um resultado semelhante, quando o polissacarídeo extraído do tegumento de sementes de *Chirisia speciosa* foi capaz de retardar em sete dias a infecção causada pelo patógeno *C. graminicola* em plantas de milho.

Segundo Steiner e Schönbeck (1995), uma das características da resistência induzida é a necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência.

No estudo de Guzzo *et al.* (1993), amostras de goma xantana foram capazes de proteger a planta nos testes de proteção em torno de 63 a 92%. Os autores

afirmam que esta proteção foi do tipo sistêmica, porque mesmo ao excisar as folhas tratadas da planta antes de inocular o patógeno, o grau de proteção conferido pelos polissacarídeos às demais folhas da planta não foi afetado. O período de 72 horas entre a aplicação dos polissacarídeos e a inoculação do patógeno foi suficiente para ativar respostas de defesa nas plantas de café, sugerindo que um sinal é produzido nas plantas dentro deste intervalo, prevenindo à distância a infecção com o patógeno.

No presente trabalho, o período de 72 horas entre a aplicação do indutor e do patógeno não foi suficiente para ativar respostas de defesa nas plantas de feijão-caupi. No estudo de Latunde-Dada e Lucas (2001) no qual o composto acibenzolar-S-metil potencializou as respostas de defesa do feijão-caupi contra o fungo *Colletotrichum destructivum*, o intervalo entre a aplicação do composto e do patógeno foi de sete dias. É possível, portanto, que aumentando o intervalo de tempo entre a primeira aplicação do indutor e a inoculação do patógeno, fossem obtidos melhores resultados.

Há diversos trabalhos na literatura onde o indutor é repetidamente aplicado nas plantas a intervalos constantes. Martins (2006) utilizou extratos a base de algas para controlar a antracnose no feijoeiro comum causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. O autor aplicou os extratos das algas após o aparecimento dos sintomas da doença nas plantas e estes continuaram a ser aplicados a cada 12 dias. A severidade da antracnose nas plantas dos dois tratamentos (extrato etanólico de *U. Fasciata* e Phyllum®) manteve-se estável cerca de trinta dias da aplicação dos extratos. Após este período, a doença evoluiu rapidamente, chegando a receber a última nota na avaliação da doença proposta por Rava (1993).

Loffaguem *et al.* (2004) avaliaram a antracnose do feijoeiro quinzenalmente em um experimento em campo, pulverizando nas parcelas a cada 30 dias extrato da alga *U. fasciata*. As parcelas que receberam pulverizações com o extrato dessa alga sofreram uma redução da severidade da antracnose em 55%, em relação ao controle. O extrato ainda superou o efeito de fungicida, que reduziu em 50% a severidade da antracnose. Os autores acreditaram que, nesse caso, o extrato da alga tenha atuado pela indução de resistência.

Mazaro (2007) testou o efeito dos indutores quitosana e acibenzolar-S-metil

(ASM) sobre doenças fúngicas do morangueiro. Neste estudo os tratamentos realizados incluíram 20 aplicações dos indutores, realizadas em intervalos de sete dias, sendo que as plantas que receberam os tratamentos apresentaram redução dos sintomas e menor incidência da doença, em comparação com o controle. De acordo com testes bioquímicos, os indutores quitosana e ASM atuaram na resistência sistêmica adquirida em morangueiro, ativando proteínas relacionadas à patogênese (Rps).

No presente estudo, foi observado que na primeira semana da inoculação do patógeno, alguns tratamentos evitaram o aparecimento dos sintomas da antracnose nas plantas. É possível que, se os polissacarídeos e oligossacarídeos fossem reaplicados nas plantas em intervalos de uma semana poderiam evitar a evolução da doença, permitindo que a planta completasse seu ciclo de vida, com a produção de grãos, sem diminuir a produtividade. Estes experimentos deverão ser realizados em estudos futuros.

5.4 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VITRO*

As xiloglucanas de jatobá e copaíba não inibiram o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*, em nenhum dos dois métodos utilizados.

Uma vez que as xiloglucanas não apresentaram nenhum efeito no crescimento do *C. gloeosporioides in vitro*, em nenhum dos métodos e concentrações testadas, pode-se sugerir que os resultados positivos nos testes de proteção nas plantas contra a antracnose, seriam resultantes de algum processo de ativação de mecanismos de defesa da planta, desencadeados pelo polissacarídeo aplicado.

O óleo de copaíba no método da difusão em disco de papel não inibiu o crescimento do fungo, na concentração utilizada. No entanto, no método de difusão em meio sólido, o óleo extraído das sementes de copaíba interferiu no crescimento micelial do patógeno, formando halos de inibição ao redor das cavidades, como mostrado na tabela 5.4. O fungo apresentou baixo crescimento micelial sobre toda a placa, quando comparado ao grupo controle, no entanto, ao redor das cavidades

contendo o óleo, havia notável esporulação. Observa-se também que o efeito do óleo de copaíba não é dependente da concentração, pois o diâmetro do halo de inibição é muito semelhante nas três concentrações utilizadas.

O solvente dimetilsulfóxido 50% que também foi utilizado para solubilizar o óleo da copaíba apresentou inibição do crescimento do fungo mesmo sem a adição do óleo e, portanto, os resultados deste teste não foram apresentados. Já o solvente Tween 80 não interferiu no crescimento do fungo e portanto, foi adequado para utilização como solvente nos testes com o óleo da copaíba.

TABELA 5.4 – EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum gloeosporioides*

	Diâmetro do halo de inibição ¹ (mm)
Hipoclorito 2,5%	30,5
Água	-----
Óleo 4%	11,8
Óleo 2%	10,5
Óleo 1%	11,0

NOTA: ¹ Diâmetro médio do halo de inibição, calculado através de média aritmética de dois sentidos diametralmente opostos. Método da difusão em meio sólido.

A regulação genética da esporulação em fungos fitopatogênicos não está totalmente esclarecida (SHI; CHRISTIAN; LEUNG, 1998). O reduzido crescimento do micélio e a grande esporulação ocasionada pelo óleo da copaíba *in vitro*, pode indicar que o óleo pode estar, de alguma forma, impedindo o acesso do fungo aos nutrientes do meio, pois segundo Carlile e Watkinson (1994), a exaustão de nutrientes do meio de cultura conduz muitos fungos à produção de esporos, enquanto nutrientes em abundância resultam em vigoroso crescimento vegetativo. Consequentemente, as condições nutricionais ótimas para esporulação e para crescimento do micélio frequentemente diferem (CARLILE; WATKINSON, 1994). Outra hipótese seria que o fungo, na presença do óleo, se tornasse mais virulento, por produzir uma elevada quantidade de esporos, sem necessitar de um grande crescimento micelial.

De qualquer forma, o óleo de copaíba não pode ser considerado antifúngico,

pois apesar de diminuir o crescimento micelial, o fungo continua a produzir muitos esporos, os quais são responsáveis por promover a disseminação do patógeno e por serem determinantes da severidade da doença na planta (SHI; CHRISTIAN; LEUNG, 1998).

O polissacarídeo obtido das sementes de *Hyptis fruticosa* e o exsudato da paineira realizados no método de difusão em meio sólido não apresentaram nenhum efeito sobre o crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, quando comparados às placas controle.

6 CONCLUSÕES

A partir dos cotilédones de copaíba e jatobá foram isoladas xiloglucanas com rendimentos de 12,6% e 16,5%, respectivamente, em relação à massa dos cotilédones deslipidificados e secos. Estas amostras apresentaram perfil homogêneo por HPSEC-MALLS/RI e, de acordo com as dosagens colorimétricas realizadas, possuem alto teor de açúcar e baixa quantidade de contaminantes, como proteínas. A massa molar média calculada para estes polissacarídeos foi de $7,48 \times 10^5$ g/mol para a copaíba e $8,48 \times 10^5$ g/mol para o jatobá.

O cromatograma do material proveniente do tratamento enzimático da xiloglucana, assim como no sobrenadante etanólico proveniente da precipitação do polissacarídeo, confirmou a presença de oligossacarídeos nestas. No sobrenadante etanólico, também foi evidenciada a presença de monossacarídeos livres.

O microcultivo do fungo, aliado às características macroscópicas da colônia confirmam a identidade do fungo *C. gloeosporioides*.

As xiloglucanas, o exsudato dos frutos da paineira e o polissacarídeo das sementes de *Hyptis fruticosa* não apresentaram nenhum efeito no crescimento do patógeno *C. gloeosporioides in vitro*, em nenhum dos métodos e concentrações testadas.

O óleo extraído das sementes de copaíba diminuiu o crescimento micelial do fungo nas três concentrações testadas, no entanto houve notável esporulação ao redor das cavidades contendo o óleo.

No ensaio biológico *in vivo*, a xiloglucana de copaíba nas concentrações de

50, 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ foi capaz de proteger as plantas da antracnose temporariamente por duas semanas, com o grau de proteção variando de 60 a 70%. Os oligossacarídeos naturais e os obtidos por hidrólise enzimática da copaíba conferiram aproximadamente 60% de proteção às plantas até o 15º dia da inoculação do fungo.

REFERÊNCIAS

- ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE (APG II). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. Bot. J. Linn. Soc. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/welcome.html>. Acesso em: 05/10/2009.
- ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.; FREIRE, K.R.L.; SOUZA, E.L.; SANTOS-FILHO, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista Patologia Tropical**, v.33, p. 55-64, 2004.
- BAILEY, J.A.; NASH, C.; O'CONNELL, R.J.; SKIPP, R.A. Infection process and host specificity of a *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of cowpea, *Vigna unguiculata*. **Mycological Research**, v. 94, p. 810-814, 1990.
- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. J.A. Bailey e M. J. Jeger, eds. CAB Int., Wallingford, UK. 1992. p.88-120.
- BARRETO, A.L.H.; ELOY, Y.R.G.; MATOS, T.E.; MARTINS-MIRANDA, A.S.; FREIRE, F.C.O.; FREIRE-FILHO, F.R.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. Respostas de defesa da planta impedem o crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* no genótipo de feijão-caupi BR 3 tracuateua. **Embrapa Meio-Norte Circular Técnica, 2006**: versão internet. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/anais/conac2006/resumos/FS11.pdf>. Acesso em 05/10/2009.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNANDEZ-LOPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON C.L. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, v. 22, p.1087–1092, 2003.
- BANDEIRA, M.F.C.L.; TEXEIRA, M.F.S.; ABINADER, C.D.; PARENTE, R.C.; LIMA P.S.L. Avaliação *in vitro* da sensibilidade da *Candida albicans* ao hidróxido de cálcio associado ao óleo de copaíba. **Revista Dentística on line**, v. 13, p. 12-22, 2006.
- BELESKI-CARNEIRO, E.B.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Structural aspects of the exudate from the fruit of *Chorisia speciosa* St. Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 219–224, 1999.

BELESKI-CARNEIRO, E.; SUGUI, J.A.; REICHER, F. Structural and biological features of a hydrogel from seed coats of *Chorisia speciosa*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 157-163, 2002.

BIERMANN, C.J. Hydrolysis and other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMANN, C.J., MCGINNIS, G.D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, 1989. p. 27-41.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V de. ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 11- 28. 2005.

BRANDÃO, A.D.; DEL BEM, L.E.V. ; VINCENTZ, M.; BUCKERIDGE, M.S. Expression pattern of four storage xyloglucan mobilization related genes during seedling development of the rain forest tree *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Experimental Botany**, São Paulo, v. 60, p 1191–1206, 2009

BRESSANI, R. Nutritive value of cowpea. In: SINGH, S.R.; RACHIE, K.O. (Eds), **Cowpea Research, Production and Utilization**. Wiley, New York, 1985, p. 353-359.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. Galactomannans from Brazilian legume seeds1. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 13, p.109-112, 1990.

BUCKERIDGE, M.S.; ROCHA, D.C.; REID, J.S.G.; DIETRICH, S.M.C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. **Physiologia Plantarum**, v. 86, p.145-151, 1992.

BUCKERIDGE, M.S.; CROMBIE, H.J.; MENDES, C.J.M.; REID, J.S.G.; GIDLEY, M.J.; VIEIRA, C.C.J. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydrate Research Journal**, v. 303, p. 233-237, 1997.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P.D.; LIMA, D.U.D. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.137-162, 2000.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. **The fungi**. San Diego: Academic, 1994. 428p.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of cell wall during growth. **Plant Journal**, v. 3, p.1-30, 1993.

CARVALHO, A.A.T., SAMPAIO, M.C.C., SAMPAIO, F.C., MELO, A.F.M., SENA, K.X.F.R., CHIAPPETA, A.A., HIGINO, J.S. Atividade Antimicrobiana *in vitro* de Extratos Hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre Bactérias Gram-Negativas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, p. 255-258, 2002.

CAO, Y.; IKEDA, I. Antioxidant activity and antitumor activity (*in vitro*) of xyloglucan selenious ester and surfated xyloglucan. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2009.

DARVILL, A.G.; AUGUR, C.; BERGMANN, C.; CARLSON, R.W.; CHEONG, J.J.; EBERHARD, S.; HAHN, M.G.; LÓ, V.M.; MARFÁ, V.; MEYER, B.; MOHNEN, D.; O'NEILL, M.A.; SPIRO, M.D.; VAN HALBEEK, H.; YORK, W.S.; ALBERSHEIM, P. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. **Glycobiology**, v.2, p.181-198,1992.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EHLERS, J.D.; HALL, A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field Crops Research**, v. 53, p. 187-204, 1997.

ELOWAD, H.O.A.; HALL, A.E. Influences of early and late nitrogen fertilization on yield and nitrogen fixation of cowpea under well-watered and dry field conditions. **Field Crops Research**, v. 15, p. 229-244, 1987.

EMECHEBE, A.M. and SHOYINKA, S.A. Fungal and bacterial disease of cowpea in Africa. In: SINGH, S. R. and RACHIE, K. O. (editors), **Cowpea Research, Production and Utilization**. Chichester. John Wiley and Sons, 1985, p. 174–192.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). Podridão da Uva Madura ou Podridão de Glomerella – Biologia, Epidemiologia e Controle. **Circular técnica 52, 2004**: versão internet. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir052.pdf> Acesso em 15/08/2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). Cultivo do Feijão-caupi. Sistemas de Produção, 2003. Embrapa Meio-Norte: versão eletrônica. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/index.htm>> Acesso em: 17/09/2009>Acesso em: 12/10/2009.

FERY, R.L. The cowpea: production, utilization, and research in the United States. **Horticultural Reviews**, v.12, p. 197-222, 1990.

FODOR, J.; JOZSA, A.; KIRALY, Z. Systemic acquired disease resistance in plants. **Novenyvedelem**, v. 34, p. 117-126, 1998.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, p. 596-605, 1998.

FREITAS, R.A., MARTIN, S., SANTOS, G.L., VALENGA, F., BUCKERIDGE, M.S., REICHER, F., SIERAKOWSKI, M.-R. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p.507-514, 2005.

FRY, S.C. The structure and functions of xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, p. 1-11, 1989.

FRY, S.C.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J.-P.; KATO, Y.; LORENCES, E.P.; MacLACHLAN, G.A.; McNEIL, M.; MORT, A.; REID, J.S.G.; SEITZ, H.U.; SELVENDRAN, R.R.; VORAGEN, A.G.J.; WHITE, A.R. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Plant Physiology**, v. 89, p. 1-3, 1993.

GUARRO, J.; SVIDZINSKI, T.E.; ZAROR, L.; FORJAZ, M.H.; GENÉ, J.; FISCHMAN, O. Subcutaneous hyalohyphomycosis caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 3060-3065, 1998.

GUZZO S.D. ; BACH E.E. ; MARTINS E.M.F. ; MORAES W.B.C. ; Crude exopolysaccharides (EPS) from *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and commercial xanthan gum as inducers of protection in coffee plants against *Hemileia vastatrix*. **Journal of phytopathology**, v. 139, n. 2, p. 119-128, 1993.

HAHN, M.G.; DARVILL, A.G; ALBERSHEIN, P. Host-pathogen interactions XIX. The

endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. **Plant Physiology**, v. 68, p. 1161-1169, 1981.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 139-168, 1989.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica**. 2 ed. São Paulo: Premier, 1999.

KIM, Y.K.; DAOXIN, L.; PAPPACHAN, E.K. Induction of Ca^{+2} Calmodulin Signaling by Hard-Surface Contact Primes *Colletotrichum gloeosporioides* Conidia To Germinate and Form Appressoria. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 5144-5150, 1998.

KOOIMAN, P. On the occurrence of amyloids in plant seeds. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 9, p. 208-219, 1960.

KWAPATA, M.B.; HALL, A.E. Effects of moisture regime and phosphorus on mycorrhizal infection, nutrient uptake, and growth of cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field Crops Research**, v. 12, p. 241-250, 1985.

LATUNDE-DADA, A.O. Assessment of anthracnose disease in some cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) caused by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Phytopathology**, v. 130, p. 147-156, 1990.

LATUNDE-DADA, A.O.; O'CONNELL, R.J.; NASH, C.; PRING, R.J.; LUCAS, J.A.; BAILEY, J.A. Infection process and identity of the hemibiotrophic anthracnose fungus (*Colletotrichum destructivum*) from cowpea (*Vigna unguiculata*). **Mycological Research**, v. 100, p. 1133-1141, 1996.

LATUNDE-DADA, A.O.; LUCAS, J. A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 58, p. 199-208, 2001.

LEVY, S.; MACLACHLAN, G.; STAEHELIN, L.A. Xyloglucan side chains modulate

binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. **The Plant Journal**, v. 11, p. 373–386, 1997.

LIMA, N.N.; REICHER, F.; CORREA, J.B.C.; GANTER, J.L.M.S.; SIERAKOWSKI, M.R. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatoba). **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 22-26, 1993.

LIMA-NISHIMURA, N.; QUOIRIN, M.; NADDAF, Y.G.; WILHELM, M.; RIBAS, L.L.F.; SIERAKOWSKI, M.-R. A xyloglucan from seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. **Cell Biology and Morphogenesis**, v. 21, p. 402-407, 2003.

LOFFAGUEM, J.C.; HARTMANN, O.E.L.; TALAMINI, V.; STADNIK, M.J. Extratos naturais no controle da antracnose e na produtividade do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 107, 2004.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4 ed. São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora, 2002, p. 168-172.

MAO, P.C.M.; MOUSCADET, J.F.; LEH, H.; AUCLAIR, C.; HSU, L.Y. Chemical Modification of Coumarin Dimer and HIV-1 Integrase Inhibitory Activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, p. 1634-1637, 2002.

MARTINS, D.A. **Uso de extratos à base de algas para controlar a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) do feijoeiro**. 49f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006. Disponível em: <[http://www.cca.ufsc.br/labfitop/Tcc%20\(daniel\).pdf](http://www.cca.ufsc.br/labfitop/Tcc%20(daniel).pdf)> Acesso em: 07/01/2009.

MAZARO, S.M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 105p. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

McCANN, M.C.; ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wall. In: Lloyd, C.W. (Ed.) **The cytoskeletal basis of plant growth and form**. London: Academic Press, 1991, p. 109-129.

McDOUGALL, G.J; FRY, S.C. Inhibition of auxin-stimulated growth of pea stem segments by a specific nonasaccharide of xyloglucan. **Planta**, v. 175, p. 412-416,

1988.

McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.

MICHEREFF, S.J. Antracnose no feijão. In: Del Ponte, E.M. (Ed.) Fitopatologia.net - herbário virtual. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/agronomia/fitossan/fitopatologia/ficha.php?id=117#>> Acesso em: 29/11/2009.

MOHNEN, D.; HAHN, M.G. Cell wall carbohydrates as signals in plants. **Seminars in Cell Biology**, v. 4, p. 93-102, 1993.

NEOGI, U.; SAUMYA, R.; MISHRA, R.K; RAJU, K.C. Lipid Content and in vitro Antimicrobial Activity of Oil Seeds of Some Indian Medicinal Plants. **Current Research in Bacteriology**, v. 1, p. 1-6, 2008. Disponível em: <<http://scialert.net/fulltext/?doi=crb.2008.1.6>> Acesso em: 05/12/2009.

NGUYEN, T.H.P.; SALL, T.; BRYNGELSSON, T.; LILJEROTH, E. Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. **Plant Pathology**, v. 58, p. 898–909, 2009. Disponível em: <<http://eresources.library.mssm.edu:2097/cgi-bin/fulltext/122400937/PDFSTART>> Acesso em 26/11/2009.

O'CONNELL, R.J.; BAILEY, J.A. Hemibiotrophy in *Colletotrichum lindemuthianum*. In: MENDGEN, K.; LESEMANN, D.E. (Eds). **Electron Microscopy of Plant Pathogens**: Berlin, 1991, p. 211-222.

OLIVEIRA, J.T.A. Mecanismos de defesa do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) walp.] contra patógenos. In: ANAIS CONAC 2006. Disponível em: <[http://cpamn.embrapa.br/anaisconac2006/Palestras/PalestraJTA OLIVEIRA.pdf](http://cpamn.embrapa.br/anaisconac2006/Palestras/PalestraJTA%20OLIVEIRA.pdf)> Acesso em: 21/08/2009.

OLIVEIRA JUNIOR, C.J.F.; BRAGA, M.R.; BUCKERIDGE, M.S. Isolamento de oligossacarídeos de xiloglucano de dicotiledôneas através de hidrólise enzimática e cromatografia de exclusão molecular. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, p. 391-397, 2006.

PAIN, N.A.; O'CONNELL, R.J.; BAILEY, J.A.; GREEN, J.R. Monoclonal antibodies which show restricted binding to four *Colletotrichum* species: *C. lindemuthianum*, *C.*

malvarum, *C. orbiculare* and *C. trifolii*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 41, p. 111-126, 1992.

PAIVA, L.A.F.; RAO, V.S.N.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 73–78, 1998.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIM, L. (Org.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.417-453. Disponível em: <[http://www.ppippic.org/ppiweb/pbrazil.nsf/926048f0196c9d4285256983005c64de/6fedf99345cc5f6903256fdd004bf038/\\$FILE/Anais%20Sergio%20Pascholati.pdf](http://www.ppippic.org/ppiweb/pbrazil.nsf/926048f0196c9d4285256983005c64de/6fedf99345cc5f6903256fdd004bf038/$FILE/Anais%20Sergio%20Pascholati.pdf)> Acesso em 04-11-09

PETKOWICZ, C.L.O.; RECHIA, C.G.V.; BUSATO, A.P.; REICHER, F. Xiloglucanas: estrutura, propriedades e aplicações. In: **Carboidratos en alimentos regionales iberoamericanos**. Ed. LAJOLO, F.M ; MENEZES, E.W., p.127-147. Edusp: São Paulo, 2006.

RANGEL, T.B.A.; DIAS, G.B. Indução de resistência em plantas: o papel do óxido nítrico. **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia**: Vitória, n.3, p.1-8, 2007.

RAVICHANDRAN, S.; WAHIDULLA, S.; D'SOUZA, L.; RAMESHKUMAR, G. Antimicrobial Lipids from the Hemolymph of Brachyuran Crabs. **Biotechnology and Applied Biochemistry**.

RIZZARDI, M.A.; FLECK, N.G.; AGOSTINETTO, D.; BALBINOT, A.A. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. **Ciência Rural**, v. 33, 2003.

ROSARIO, M.M.T. **Obtenção e aplicação de xiloglucanas em testes sobre macrófagos peritoneais de camundongo**. 103f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/4644>>. Acesso em 03/02/2009.

ROSWALKA, L.C. **Controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira, em laboratório**. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/5273>> Acesso em: 05/01/2009.

SALAMONI, A.T.; SIERAKOWSKI, M.R.; BOEIRA, J.P.; RISCH NETO, O.A.; QUOIRIN, M. Efeito das xiloglucanas de sementes e derivados no crescimento de *Arabidopsis thaliana*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 3, p. 314-320, jul.-set., 2008. Disponível em:

<<http://www.ufsm.br/cienciaflorestal/artigos/v18n3/A4V18N3.pdf>> Acesso em: 03/02/2009.

SARDARI, S.; MORI, Y.; HORITA, K.; MICETICH, R.G.; NISHIBE, S.; DANESHTALAB, M. Synthesis and Antifungal Activity of Coumarins and Angular Furanocoumarins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1933-1940, 1999.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M.; LAFAY, J.M.; BRYGOO, J.; BAILEY, J.A. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**, v.18, p.121-138, 1994.

SHI, Z.; CHRISTIAN, D.; LEUNG, H. Interactions Between Spore Morphogenetic Mutations Affect Cell Types, Sporulation, and Pathogenesis in *Magnaporthe grisea*. **The American Phytopathological Society**, v. 11, p. 199-207, 1998. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI.1998.11.3.199>>. Acesso em: 22/11/2009.

SINGH, B.B.; EHLERS, J.D.; SHARMA, B.; FREIRE-FILHO, F.R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A. *et al* (Eds). **Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production**. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 2002. p. 22-40.

STADNIK, M.J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. SC: CCA/ UFSC: Florianópolis, 2004, p. 221-244.

STEINER, U. & SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSHMIT, R. & KUC, J. (Eds.). **Induced resistance to disease in plants**. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1995, p.86-110.

STUPP, T.; FREITAS, R.A.; SIERAKOWSKI, M.R.; DESCHAMPS, F.C.; WISNIEWSKI JR, A.; BIAVATTI, M.W. Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorffii* seeds and seed oil. **Bioresource Technology**, v. 99, p.2659-2663, 2008.

TAVARES, G.M.; SOUZA, P.E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro

(*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 52-59, 2005
VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. **Crop Science Society of America**, v. 44, p. 1920-1934, 2004.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998. Disponível em: <<http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PDF%20files/AnnuRevPhytopathol-Van%20Loon-1998.pdf>> Acesso em 10/11/2009.

VEIGA JUNIOR, V.F.; ZUNINO, L.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C.; CALIXTO, J.B. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1405-1410, 2006.

WHITE, E.V.; RAO, P.S. Constitution of polysaccharide from tamarind seed. **Journal of the American Chemical Society**, v. 75, p. 2617-2619, 1953.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-68, 1963a.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963b